รหัสโครงการ SUT3-304-40-24-10

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการทางชีวภาพให้เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนสูงเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์

(Bioconversion of Cassava Starch to High Protein Product to be used for Animal Feed)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผศ.ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

2. ผศ.ดร. หนึ่ง เตียอำรุง สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2541

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2543

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2541 และผู้เขียนขอขอบคุณ อภิญญา รัตนะจิต และคุณ พจนา ชุ่มชุนหด ที่ได้ทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัยและจัดทำรายงานฉบับนี้สำเร็จ

นันทกร บุญเกิด

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตอาหารสัตว์เพิ่มโปรตีนจากมันสำปะหลังและวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมิเลส โดยได้แยกเชื้อราและยีสต์จากกากมันสำปะหลัง ข้าวหมาก และลูกแป้งหลายแหล่ง และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งโดยวิธีตรวจสอบด้วยไอโอดีนในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบพบว่าเชื้อราสร้างเส้นใย SUT1 ซึ่งอยู่ในสกุล *Chlamydomucor* สามารถย่อยมันสำปะหลังดิบได้ดี วัดค่ากิจกรรมอะมิเลสสูงกว่าเชื้ออื่นที่นำมาทดสอบ กล่าวคือมีค่า α และ β อะมิเลส 2.81 หน่วยและ 1.25 หน่วย ตามลำดับ จึงเลือกจุลินทรีย์ดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทดลองหมักมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการนึ่งด้วยไอน้ำ และศึกษาภายใต้อุณหภูมิห้อง โดยไม่ปรับค่าความเป็นกรดด่างของวัตถุดิบ ซึ่งโดยปกติวัสดุหมักมีค่า pH ในช่วง pH 5-pH 7 เชื้อรา SUT1 สามารถย่อยมันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่งได้ดีกว่ามันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการนึ่ง เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ได้ค่าสูงสุดที่ 680.07 มิลลิกรัมต่อกรัมหลังการหมักมันสำปะหลังนึ่งเป็นเวลา 5 วัน และเมื่อประยุกต์การใช้เชื้อในรูปลูกแป้งของเชื้อผสมระหว่างเชื้อรา SUT1 กับเชื้อยีสต์ *Candida utilis* เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของลูกแป้งซึ่งสามารถลดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ 5 log CFU ต่อกรัมและสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้นได้เมื่อมีการปรับปริมาณยูเรียที่ใช้ให้เหมาะสมในการเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ 1% ภายในเวลา 6 วัน เพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงพัฒนาการหมักแบบ Non aseptic solid state fermetation ในถังหมักขนาด 540 ลิตรต่อไป จากการศึกษาขั้นต้นพบว่าได้โปรตีนที่ 15.3% และมีอะมิโนไนโตรเจน 11% ซึ่งปริมาณสูงเพียงพอที่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป

ABSTRACT

This study was aimed at producing protein-enriched animal feed from cassava and its waste by the conversion of cassava by using amylase-producing fungi. Mold and yeast which produce amylase were isolated from cassava waste, khao-mak and various mold-brans (look-pang). It was found that the filamentous fungi strain no. SUT1 which belongs to the genus *Chlamydomucor* was proved to be the best amylase producing strain. This fungi exhibited high α and β-amylase activities at 2.81 units and 1.25 units, respectively. Pretreatment of cassava was done by steaming and non-steaming. The cassava fermentation was conducted in solid state using urea as the nitrogen source. Under room temperature and uncontrolled pH, which stands commonly at between pH 5-7, steamed cassava was saccharified better than non-steamed cassava. Reducing sugars were obtained at 680.07 mg/g from steamed raw cassava after 5 days of fermentation when using inoculum in the form of look-pang. It was found that the contamination was reduced in 5 log CFU/g. The protein content from this fermentation condition which was amended with 1.0% urea was reached maximum at 18.3% within 6 days of cultivation. To reduce the production cost, non aseptic solid state fermentation in size of 540-L was recommended. After preliminary test, protein content could be obtained at 15.3% with composed of 11% amino nitrogen that high enough to use for animal feed in further.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก

บทคัดย่อภาษาไทย.....ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....ฉ

สารบัญรูปภาพ.....ช

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....2

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....4

1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....4

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....4

บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์.....5

2.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง.....5

2.3 การวัดประสิทธิภาพของเชื้อในการผลิตเอนไซม์อะมิเลส.....5

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบ Solid state fermentationในระดับห้องปฏิบัติการ.....6

2.5 การผลิต Biomass protein production ในถังหมักขนาด 540 ลิตร..... 7

บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....8

3.2 การศึกษาผลของซับสเตรตที่เหมาะสมต่อกระบวนการ Saccharification.....10

3.3 การเตรียมหัวเชื้อในรูปลูกแป้ง.....11

3.4 ประสิทธิภาพของลูกแป้ง *Chlamydomucor* SUT1 ต่อกระบวนการ Saccharification....11

3.5 การผลิต Biomass protein production ในการหมักแบบ Solid state fermentation โดยใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมระหว่าง *Chlamudomucor* SUT1 และ *Candida utilis* 12

บทที่ 4 สรุปผลงานวิจัย

บรรณานุกรม.....19

ภาคผนวก ก.....21
ภาคผนวก ข.....27
ประวัติผู้วิจัย.....36

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงขนาดของ clear zone บน Starch agar ในการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบขั้นต้น..... 27
2. แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch agar ของเชื้อทั้งหมด 27 Isolates ที่แยกได้จากกากมันสำปะหลัง ข้าวหมาก รวมทั้งลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ และผ่านการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบขั้นต้นแล้ว.....28
3. ผลการยืนยันชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการย่อยแป้งขั้นต้นโดยการย้อมสีแกรม.....30
4. แสดงประสิทธิภาพการย่อยข้าวเหนียวของเชื้อแต่ละ Isolate เปรียบเทียบกับลูกแป้งชาวบ้าน.....31
5. แสดงประสิทธิภาพของ Type culture strains ในการย่อยข้าวเหนียว.....33
6. แสดงผลการศึกษาแอคติวิตีของอะมิเลสในข้าวเหนียวนึ่งจากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ภายหลังการบ่ม 3 วัน.....34
7. แสดงผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะมิเลส (Amylase activity)เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีมันเส้นบด 8% จากการวิเคราะห์ จากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตขึ้น.....35
8. แสดงผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะมิเลส (Amylase activity)เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีมันเส้นบด 8% จากการวิเคราะห์ จากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตขึ้นของเชื้อ *Chlamydomucor* SUT1 เปรียบเทียบกับ Type culture strain.....9

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1. แสดงการทำงานของเอนไซม์อะมิเลสในการย่อยแป้ง.....3
2. ก) ถังหมักขนาด 540 ลิตรเป็นแบบมีล้อเคลื่อนที่สะดวกในการเคลื่อนย้าย มีสายยางสำหรับทำการนึ่งด้วยไอน้ำโดยการต่อเชื่อมเข้ากันหม้อนึ่งได้โดยง่าย ข) แสดงลักษณะภายในของถังหมักซึ่งมีตะแกรงเหล็กไว้สำหรับรองรับวัตถุดิบ.....7
3. ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 ที่เจริญบนอาหารที่มี แป้งมันสำปะหลัง 2% เมื่อเชื้อมีอายุ 2 วัน ข) ลักษณะรูปร่างสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....9
4. แสดงผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยเปรียบเทียบกันระหว่างซับสเตรตที่แตกต่างกัน 4 ชนิดดังนี้ 1) มันเส้น 2) มันสด 3) มันเส้นนึ่ง และ 4) มันสดนึ่ง.....10
5. แสดงประสิทธิภาพของหัวเชื้อลูกแป้งต่อกระบวนการ Saccharification เปรียบเทียบระหว่างซับสเตรต มันสดนึ่ง และ มันเส้นนึ่ง.....11
6. แสดงความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในการหมักมันสดนึ่งในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ลูกแป้งของเชื้อผสม (*Chlamydomucor* SUT1 และ *C.utilis*).....13
7. เปรียบเทียบปริมาณการเพิ่มขึ้นของอะมิโนไนโตรเจนเมื่อใช้ยูเรียที่ระดับ 1% และที่ 1.25% ในการหมักมันสดนึ่งตามลำดับ.....13
8. แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวส์ pH ความชื้น โปรตีน และ อะมิโนไนโตรเจนในการหมักมันสำปะหลังเมื่อใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมที่พัฒนาขึ้นในระดับห้องปฏิบัติการ 14
9. แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวส์ pH ความชื้น โปรตีน และ อะมิโนไนโตรเจนในการหมักมันสดนึ่ง เมื่อใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมที่พัฒนาขึ้นในถังหมักขนาด 540 ลิตร.....15
10. แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะมันสำปะหลังในการหมักแบบ Solid state fermentation ในถังหมักขนาด 540 ลิตร ก) มันสดนึ่งก่อนการหมัก ข) มันสดนึ่งในวันที่ 2 ของการหมัก ค) วันสุดท้ายของการหมัก ง) หลังการตากแดดจนแห้งจุดประสงค์เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป.....16

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดรายหนึ่งของโลก และการผลิตมันสำปะหลังมีมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีกำลังการผลิตสูงกว่า 20 ล้านตันต่อปี ประมาณ 70% ของผลผลิตทั้งหมดสามารถแปรรูปหัวมันสดเหล่านี้ส่งออกขายในรูปมันเส้น หรือมันอัดเม็ดเพื่อเป็นอาหารสัตว์ไปยังกลุ่มประเทศประชาคมยุโรป นอกจากส่งออกแล้วยังเหลือใช้ภายในประเทศในปริมาณสูง แต่ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่า กลุ่มประเทศยุโรปได้เปลี่ยนนโยบายเกษตรร่วม (Common Agricultural Policy : CAP) ยกเลิกการสนับสนุนพืชผลในกลุ่มประเทศจึงทำให้ราคาของพืชผลและธัญพืชมีราคาถูกลงมาก เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ ความจำเป็นในการนำเข้ามันสำปะหลังจึงลดลง (กล้าณรงค์, 2538) ส่งผลกระทบให้ราคามันสำปะหลังในท้องตลาดมีราคาถูกลงมาก การนำหัวมันที่ผลิตขึ้นมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าทัดเทียมหรือมากกว่าการแปรรูปเป็นมันอัดเม็ด หรือมันเส้นเช่นเดิมเพื่อใช้ภายในประเทศ น่าจะเป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่สุดที่จะสามารถผดุงราคามันสำปะหลังไว้ได้

มันสำปะหลังส่วนใหญ่จะถูกแปรรูปไปใช้ในรูปแป้งมันสำปะหลัง และวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ เช่น การผลิตสารให้ความหวาน เช่น กลูโคส ไฮฟรุกโทสไซรัป เด็กตรินและมอลโทส ซึ่งในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมดังกล่าวจะมีวัสดุเหลือทิ้งเกิดขึ้นในปริมาณมาก เพื่อที่จะลดปัญหาการกำจัดของเสียและนำมันสำปะหลังที่ล้นตลาด จึงมีการนำมันสำปะหลังมาเพิ่มมูลค่าโดยการแปรรูปเป็นอาหารสัตว์โปรตีนสูงเริ่มจากกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ด้วย Amylolytic enzyme เช่น Alpha amylase, Beta amylase, Glucoamylase และ Pullulanase ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ที่ย่อยแป้งเหล่านี้ปรกติไม่เป็นพิษและปลอดภัยสำหรับการผลิตเป็นอาหารสัตว์

แป้งประกอบด้วยโพลิเมอร์ 2 ชนิด คือ α-D-glucose Amylose และ Amylopectin ในรูปโครงสร้างที่เป็นสันตรงและแบบมีกิ่งก้าน ตามลำดับ ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้มีการใช้เอนไซม์ Alpha amylase และ Beta amylase และ Glucoamylaseในการเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส โดย Alpha amylase และ Beta amylase ซึ่งจะย่อยแป้งตรงตำแหน่งพันธะ α-(1$\rightarrow$4) ได้เป็นน้ำแป้งและมอลโทสแต่จะไม่ย่อยพันธะ α-(1$\rightarrow$6) จึงไม่เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นเพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ต้องใช้ เอนไซม์ Amyloglucosidase เข้ารวมซึ่งจะผลิตกลูโคสครั้งละ 1 โมเลกุลจากปลาย non-reducing end ของแป้งที่ตำแหน่งพันธะ α-(1$\rightarrow$6) เอนไซม์เหล่านี้สามารถผลิตได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มเชื้อรา ตัวอย่างเช่น *Aspergillus awamori*, *Endomucopsis*

sp., *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, *Bacillus megaterium*, *B. sterothermophilus* และ *B. subtilis* เป็นต้น (Zeikus, 1991)

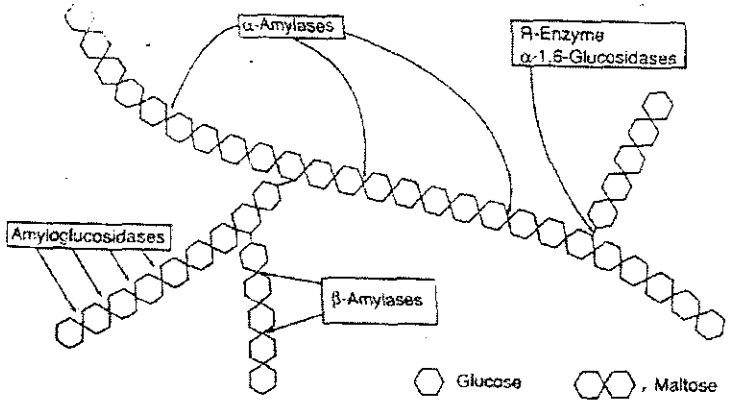
การแปรรูปมันสำปะหลังนั้นควรจะต้องพิจารณาถึงองค์ประกอบที่มีอยู่เป็นหลัก ในหัวมันสดโดยทั่วไปจะมีน้ำประมาณ 50-60% คาร์โบไฮเดรต 30-35% สารสกัดอื่นๆ 0.2-0.6% โปรตีน 1-2% ส่วนวิตามินและเกลือแร่ค่อนข้างต่ำ ถึงแม้มันสำปะหลังจะมีโปรตีนต่ำแต่อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังมีปริมาณแคลเซียมและวิตามินสูง ซึ่งถ้าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้นได้โดยการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแป้งที่มีอยู่กว่า 20% ก็น่าจะใช้เป็นอาหารสัตว์โปรตีนสูงได้ ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ลงได้ โดยการทดแทนการเพิ่มปริมาณโปรตีนจากเปลือกถั่วซึ่งมีราคาสูง มาเป็นโปรตีนจากเซลล์จุลินทรีย์

เนื่องจากแนวทางการแปรรูปมันสำปะหลังในปัจจุบัน ต้องพิจารณาถึงสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ดังนั้นในช่วงระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมา การหมักแบบ Solid state fermentation จึงหันมาเป็นที่สนใจที่จะนำมาใช้แทนการหมักแบบ Submerged fermentation ได้แก่การหมักแบบ Batch fermentation Continuous fermentation และ Fed batch fermentation เป็นต้น เนื่องจากใช้พลังงานในการผลิตต่ำ ปริมาณน้ำทิ้งน้อยกว่า ซึ่งเป็นผลให้ไม่ต้องเสียค่าบำบัดน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเน้นการหมักแบบ Solid state fermentation ในการผลิตโปรตีนจากจุลินทรีย์โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกคือมันสำปะหลังที่ทำให้ต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ต่ำ ถึงแม้ว่าเคยมีรายงานการผลิตโปรตีนโดยการใช้ Solid state fermentation อยู่บ้างแล้วแต่ปริมาณโปรตีนที่ได้รับยังไม่สูงพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ซับสเตรตที่เหมาะสมและ การปรับสภาวะการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นโดยการหมักแบบ Solid state Fermentation

1.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มันสำปะหลังและวัสดุเหลือทิ้งเป็นของเหลือที่เป็นผลผลิตทางการเกษตร ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมัน ถึงแม้ว่ามันสำปะหลังจะมีปริมาณโปรตีนต่ำ (1-2%โปรตีน) แต่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ได้ (Balagopalan, 1988) โดยการที่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งเพื่อที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Sreeramamurthy, 1945) มีรายงานว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบได้เพียง 48.3% ในขณะที่ความสามารถในการย่อยแป้งมันสุกที่ผ่านการนึ่งแล้วได้ถึง 72.9% ซึ่งมันสำปะหลังจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ จุลินทรีย์มีการเจริญ เพิ่มปริมาณโปรตีนในซับสเตรต เมื่อนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์จะได้ อาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และยังเพิ่มความสามารถในการย่อย (Digestibility) อีกด้วย

มันสำปะหลังประกอบด้วยแป้ง (Polysaccharide) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรต ในกระบวนการ Saccharification เอนไซม์ชนิด Endoamylase จะย่อยที่ตำแหน่งพันธะ ∝-(1→4) ได้ผลิตผลเป็นมอลโทส เอนไซม์เหล่านี้ไม่สามารถย่อยพันธะ ∝-(1→6) ทำให้แป้งไม่สามารถถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อทำงานร่วมกัน Exoamylase ซึ่งจะย่อยได้กลูโคสจาก Non-reducing end ซึ่งจะตัดตรงตำแหน่งพันธะ ∝-(1→4), ∝-(1→6) และ พันธะ ∝-(1→3) ซึ่งจะผลิตกลูโคสได้มากขึ้น



รูปที่ 1 แสดงการทำงานของเอนไซม์อะมิเลสในการย่อยแป้ง (ที่มา; Helmut,1998)

เอนไซม์เหล่านี้พบในเชื้อรา และยีสต์ มีรายงานว่าการหมักสำปะหลังแบบ Solid state โดยใช้เชื้อ *Rhizopus* spp. สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้นจนถึงระดับ 3.4% และได้มีการพัฒนาใช้วิธีการทางจุลชีววิทยาเพิ่มปริมาณโปรตีนด้วยการเติมสารอาหารอื่นเข้าไปในปริมาณต่ำ และการหมักแบบ Solid state โดยใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตมันสำปะหลังหมักโปรตีนสูงที่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ได้ถูกนำมาใช้ โดยมีการทดลองเติมมูลไก่, เปลือกสับปะรด และถั่วลิสง เพื่อเป็นแหล่งไนโตเจนเพื่อที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักมันสำปะหลัง การหมักมันสำปะหลังโดยตรงโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus, Neurospora* และ *Rhizopus* ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้นได้ถึง 3% จากการทดสอบเติมแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เปลือกสับปะรด 25% สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนขึ้นได้ 4.5% ขณะที่เมื่อทดลองเติม 12.5% เปลือกสับปะรดและ 12.5% มูลไก่ ปริมาณโปรตีนเพิ่มถึง 7% อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณโปรตีนโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ก็ยังให้ผลต่ำกว่าการเติมถั่วเหลืองและถั่วลิสง (Balagopalan, 1988)

แนวคิดในการวิจัยนี้ได้มาจากการทำอาหาร Tape Ketella ซึ่งเป็นอาหารของอินโดนีเซียซึ่งเตรียมได้จากการนำมันสำปะหลัง ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กขนาด 2×4 เซนติเมตร ทาผงหัวเชื้อ Ragi ซึ่งได้มาจากฟ่างข้าวแล้วนำไปห่อใบตอง หรือตัดเป็นชิ้นขนาด 30×4 เซนติเมตร วางในถาดคลุมด้วยใบตอง ประมาณ 5-7 วันจะมีลักษณะนุ่ม และมีรสหวานปนแอลกอฮอล์ รับประทานได้โดยตรง (ชัยวัตน์, 2520)

Cephalosporium eichhorniae 152 เชื้อราที่สร้างเส้นใย แยกได้จากดินซึ่งใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนกรด และอุณหภูมิสูงได้ ซึ่งโตได้ดีที่ 45°C และ pH 3.8 และสามารถใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารในการเจริญได้ดี เป็นผลดีต่อการผลิต Biomass protein (Charoensiri และคณะ, 1990)

Yuthavong และ Gibbons (1994) รายงานว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยให้เชื้อ *C. eichhorniae* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงในกระบวนการผลิตแบบ solid state fermentation ในการศึกษาพบว่า การผสมแกนข้าวโพดลงไปเป็นการช่วยในการถ่ายเทอากาศในถังหมักดีขึ้น ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนถึง 12-19% หลังการหมัก 1 สัปดาห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยมันสำปะหลังได้ดีเพื่อที่จะนำไปใช้ในกระบวนเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในการผลิตอาหารสัตว์โปรตีนสูงเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด
2. เพื่อให้ได้สภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิต Biomass protein โดยการใช้การหมักแบบ Solid state fermentation

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยเน้นทางด้านการเปลี่ยนแป้งจากหัวมันสำปะหลัง และที่เหลือใช้จากโรงงานผลิตแป้งมัน เพื่อเปลี่ยนให้เป็นวัสดุที่มีโปรตีนสูงสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ แต่ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปปรับใช้ได้กับวัสดุแป้งอื่นๆที่มีความคล้ายคลึงกัน

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ทำให้ได้และทราบถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีบทบาทในการย่อยแป้งจากหัวมันสำปะหลังและวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังและชนิดที่สามารถที่เพิ่มปริมาณโปรตีนหลังจากมีการเปลี่ยนแปลง ในที่สุดจะทำให้ทราบถึงกระบวนการผลิตวัตถุดิบที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ที่เพิ่มโปรตีน นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังลดมลภาวะของโรงงานเพราะเศษเหลือเหล่านี้ ทางโรงงานไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลังจากเสร็จสิ้นงานวิจัยนี้ ทางโรงงานสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ หรือจำหน่ายให้ผู้ที่ต้องการได้

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลังเหลือทิ้งจากโรงงานและลูกแป้งข้าวหมากหลายแหล่ง โดยการใช้อาหาร Cassava starch agar (ภาคผนวก ก) เลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน และแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จากนั้นเก็บบนอาหาร Starch agar slant ที่มีปริมาณแป้ง 1% เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.2 การคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง

การคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบขั้นต้น โดยการทดสอบแป้งที่เหลือจากการย่อยแป้งดิบด้วยสารละลายไอโอดีน โดยเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้ที่มีอายุ 48-72 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Starch agar plate และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน วัดความกว้างของ clear zone เลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งไว้ศึกษาต่อไป

การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งขั้นสุดท้าย เป็นการทดสอบ Saccharification ของแป้ง (Amylase activity) โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้เลี้ยงบน Starch agar slant อายุ 72 ชั่วโมง มาทำ suspension ของเซลล์หรือสปอร์ด้วย Sodium phosphate buffer pH 7.0 ปลอดเชื้อและ 0.1% Tween 80 ปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตามขั้นตอนดังนี้

1. ถ่ายเชื้ออายุ 3 วันปริมาณเท่าๆกัน (1 มิลลิลิตร /1 flask) ลงในอาหารที่มีมันเส้นบด 8% (Cassava broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร (ทุกเชื้อทำการทดลอง 2 ซ้ำ)
2. นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง.
3. นำอาหารเหลวที่ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกเอาเซลล์และตะกอนมันเส้นบดออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที น้ำใสที่ได้เป็นส่วนของ crude enzyme นำไปหา Amylase activity ตามวิธี DNS Micro method (James, 1995)โดยจะตรวจสอบทั้ง α-amylase และ β-amylase และ Glucoamylase (ดูภาคผนวก ก)

2.3 การวัดประสิทธิภาพของเชื้อในการผลิตเอนไซม์อะมิเลส

การวัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์อะมิเลสทำได้โดยการวัดปริมาณของน้ำตาลรีดิวซิ่ง โดยวัดสีที่เกิดขึ้นเนื่องจากน้ำตาลรีดิวส์ทำปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrosalisylic acid ซึ่งให้สีน้ำตาลแดง ตามวิธีของ

Bernfeld (1951) โดยกำหนดให้หน่วยเอ็นไซม์ (1 unit) หมายถึงปริมาณเอ็นไซม์ที่ย่อยซับสเตรด (substrate) และให้น้ำตาลรีดิวส์ (คำนวนเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสมาตรฐาน) 1 ไมโครโมลต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย pH ขึ้นอยู่กับชนิดของเอ็นไซม์ และแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอ็นไซม์หมายถึงกิจกรรมของเอ็นไซม์เป็น unit ต่อหนึ่งหน่วยหปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม) ซึ่งการหาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอ็นไซม์ที่สกัดได้จะใช้วิธีของ Lowry *et al.* (195[illegible]

คัดเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีไว้ศึกษาต่อไปในขั้นตอนการหมักมันสำปะหลังต่อไป นอกจากนั้นยังได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยข้าวเหนียวของเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกก่อนที่จะนำไปหมักมันสำปะหลังในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณโปรตีน (Biomass Protein) โดยการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการหมักข้าวเหนียว ซึ่งทำโดยการใส่ suspension ของเชื้อที่ 10^6 เซลล์หรือสปอร์ต่อ1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุข้าวเหนียวนึ่ง 50 กรัม แล้วบ่มเป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำข้าวเหนียวไปวิเคราะห์หาปริมาณกูลโคสตามวิธี DNS Micro method (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบ Solid state fermentation ในการผลิต Biomass Protein จากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักแบบ Solid state fermentation โดยใช้เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วรวมกับ Yeast ที่เป็น Type Culture Strains ในวัตถุดิบมันสำปะหลังแบบต่างๆ ดังนี้

1) มันสดหั่นขนาด 1x1 เซนติเมตร
2) มันสดหั่นขนาด 1x1 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่ง 15 นาที
3) มันเส้นบดหยาบ
4) มันเส้นบดหยาบที่ผ่านการนึ่ง 15 นาที

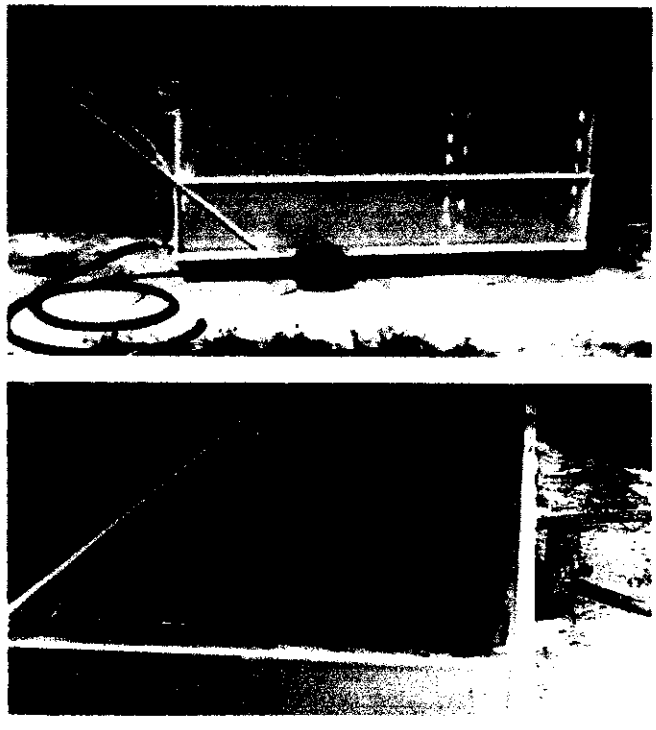
เพื่อให้ทราบรูปแบบของซับสเตรดที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณโปรตีน โดยทำการหมักในบีกเกอร์ขนาด 250-มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นอกจากนี้ยังศึกษาถึงปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการหมักดีที่สุด ในการทดลองนี้เลือกที่จะใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นต่างๆกันดังนี้ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25% เนื่องจากว่ามีรายงานว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าโปรตีนสูงโดยไม่จำเป็นต้องปรับค่า pH (Ready และ Gregory, 1975) และทำการหมักภายใต้อุณหภูมิห้อง ขนาด Dry inoculum ที่ใช้ 0.4% (10^{7-8} เซลล์ หรือ สปอร์ต่อ 1 กรัม)

*ภายหลังการหมัก วัดค่า pH ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โปรตีน และ อะมิโนไนโตรเจน เมื่อได้*สภาวะที่เหมาะสมแล้วจะนำไปขยายขนาด โดยใช้ถังหมักขนาด 540 ลิตร ต่อไป

2.5 การผลิต Biomass Protein Production ในถังหมักขนาด 540 ลิตร

หลังจากทราบสภาวะและซับสเตรตที่เหมาะสม สำหรับการหมักจากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการแล้ว ก็ได้นำผลการทดลองดังกล่าวไปขยายขนาด (Scale up) เพื่อหมักมันสำปะหลังในระดับใหญ่ขึ้นโดยใช้ถังหมักขนาด 540 ลิตรที่ทำจากอลูมิเนียมสามารถกันสนิมได้ ถังหมักดังกล่าวมีลักษณะเป็นถังสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีตะแกรงเหล็กด้านในสำหรับรองรับวัตถุดิบ มีท่อสายยางชนิดทนความร้อนที่สามารถต่อกับ Autoclave สำหรับผ่านไอน้ำเข้าไป sterileวัตถุดิบภายในถังหมักได้ (รูปที่ 2ก, 2ข)

การหมักมันสำปะหลัง โดยการเลือกใช้หัวมันสำปะหลังสดหั่นให้มีขนาด 1x1x1 นิ้ว นำไปผ่านการนึ่งเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งจะสังเกตได้ว่าลักษณะภายนอกของมันสำปะหลังจะใสเนื่องจากการเกิด gelatinization เติมยูเรีย 1% เพื่อให้เชื้อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยคลุกให้เข้ากัน หลังจากนั้นจึงเติม Dry inoculumในรูปลูกแป้งของเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *Chlamydomucor* SUT1และ เชื้อ *Candida utilis* ที่ผ่านการบดเป็นผงแล้ว โดยใช้ปริมาณ starter culture 4% ทำการหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันแรกของการหมักจนครบ 6 วัน โดยการเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บแบบสุ่มจาก 3 จุดภายในถังหมัก ตัวอย่างที่ได้จะทำการวัดค่า pH น้ำตาลรีดิวส์ ความชื้น โปรตีน และอะมิโนไนโตรเจน



(ก)

(ข)

รูปที่ 2 ก. ถังหมักขนาด 540 ลิตรเป็นแบบมีล้อเคลื่อนที่สะดวกในการเคลื่อนย้าย มีสายยางสำหรับทำการนึ่งด้วยไอน้ำโดยการต่อเชื่อมเข้ากันหม้อนึ่งได้โดยง่าย

ข. แสดงลักษณะภายในของถังหมักซึ่งมีตะแกรงเหล็กไว้สำหรับรองรับวัตถุดิบ

บทที่ 3

ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

เริ่มจากการเก็บตัวอย่างกากมันสำปะหลังจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง และลูกแป้งข้าวหมากจากหลายแหล่งภายในท้องถิ่น จังหวัด นครราชสีมา พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบเริ่มต้นได้ทั้งหมด 37 isolates จากเริ่มต้น 122 isolates ซึ่งรวมทั้งเชื้อ รา ยีสต์ และแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 1, ภาคผนวก ข ซึ่งได้ทำการบันทึกลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Starch agar ได้ผลดังตารางที่ 2, ภาคผนวก ข นอกจากนั้นยังทำการยืนยันชนิดของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี การย้อมสีแบบแกรม (ตารางที่3, ภาคผนวก ข) หลังจากที่สามารถคัดเลือกเชื้อได้จำนวนหนึ่งแล้ว นำไปศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยข้าวเหนียวโดยทำวิธีเดียวกับการทำข้าวหมากโดยจะใช้เชื้อบริสุทธิ์ (ภาคผนวก ก) เนื่องจากสมมุติฐานที่ว่ามันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้าวซึ่งมี amylose 15-17% เช่นกัน ถ้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ดีเชื้อนั้นก็น่าจะสามารถย่อยมันสำปะหลังได้เช่นกัน หลังการหมักเชื้อเป็นเวลา 3 วันก็จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเดียวกันกับข้าวหมากถ้าเชื้อนั้นมีการผลิตเอนไซม์ amylase มาย่อยแป้งที่มีอยู่ในข้าวได้ โดยจะทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของข้าวเหนียวทุกๆวันเป็นเวลา 3 วันหลังจากนั้นจะผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัด reducing sugar ตามวิธีการ Dinitrosaljcylic acid (DNS) micro method ซึ่งในการทดสอบดังกล่าวได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานที่มีการรายงานแล้วว่า มีความสามารถในผลิตเอนไซม์ได้ดีซึ่งเชื้อดังกล่าวล้วนแล้วแต่เคยมีรายงานว่ามีบทบาทในลูกแป้งข้าวหมาก ดังเช่น เชื้อในกลุ่ม *Rhizopus, Aspergillus, Saccharomycopsis* และ *Endomycopsis* เป็นต้น (ตารางที่ 4, 5, 6 ในภาคผนวก ข.) เมื่อคัดเชื้อได้แล้ว ก็ได้ทำการวัด amylase activity ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ amylase ของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมันเส้นบด 8% โดยทำการวัดทั้ง Alpha และ Beta amylase ผลดังแสดงในตารางที่ 7 ภาคผนวก ข. และตารางที่ 8

จะเห็นได้ว่าเชื้อรา SUT1 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงที่สุดในการผลิตทั้งเอนไซม์ Alpha และ Beta amylase โดยวัด Total activity และ Specific activity ของ Alpha amylase ได้ ที่ 2.81 Unit และ 35.16 Unit/mg ตามลำดับ ในขณะที่ผลิต Beta amylase ได้ Total activity และ Specific activity; 1.25 Unit และ 15.63 Unit/mg ตามลำดับ

ตารางที่ 8. แสดงผลการวิเคราะห์หา Amylase activity เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีมันเส้นบด 8%

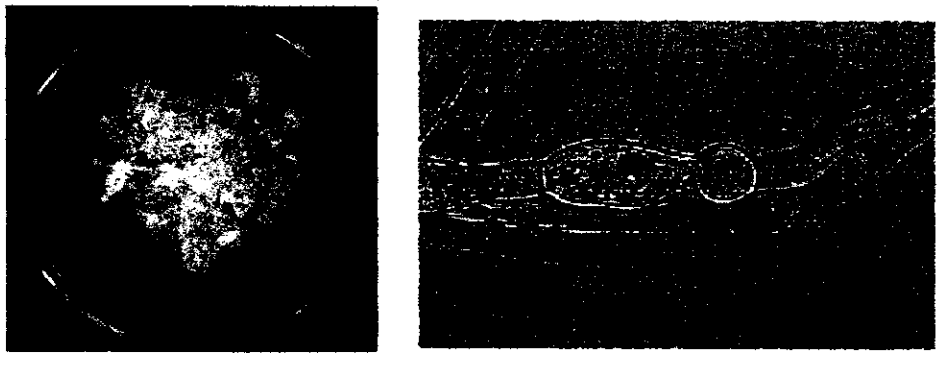
Culture Strain	Protein (mg)	Alpha amylase		Beta amylase		Glucoamylase	
		Total act. (U)	Specific act. (U/mg)	Total act. (U)	Specific act. (U/mg)	Total act. (U)	Specific act. (U/mg)
Mold SUT.1	0.0800	2.81	35.16	1.25	15.63	-	-
Rhizopus spp.	0.0450	1.04	23.15	-	-	0.38	8.42
Penicillium sp.	0.0575	1.88	32.61	-	-	1.26	21.96
Endomycopsis fiburigera	0.0500	1.46	29.17	1.25	25.00	2.53	50.51
Saccharomycopsis fiburigera	0.0240	2.19	91.16	-	-	2.90	121.00

U = 1 unit of α, β amylase defined as 1μmol of maltose that liberated at 30°C pH 6.9 and 4.8 respectively,

U = 1 unit of glucoamylase defined as 1μmol of glutose that liberated at 37°C pH 4.5

หลังจากพบว่าเชื้อรา Mold SUT1 เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิต amylase และย่อยแป้งได้ดี ก็ได้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อโดยเริ่มจากการนำเชื้อดังกล่าวไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อราดังกล่าว สร้างเส้นใยแบบ non septate mycelium และสร้างสปอร์ไม่มีสีซึ่งเป็นแบบ Chlamydospore กระจายทั่วไปบนเส้นใยดังรูปที่ 3 ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Chlamydomucor* ซึ่งมีตรงกับที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อราที่มีบทบาทและพบทั่วไปในลูกแป้งข้าวหมาก (ชัยวัฒน์, 2520) ทำให้แน่ใจได้ว่าเชื้อราดังกล่าวไม่เป็นอันตรายในการนำไปผลิตเป็นอาหารทั้งอาหารคนและอาหารสัตว์ สิ่งหนึ่งที่ทำให้เชื้อดังกล่าวน่าสนใจและเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นอาหารก็เพราะมันสร้างสปอร์ที่ไม่มีสี ซึ่งจะไม่มีผลต่อลักษณะภายนอกของอาหารทำให้อาหารที่ได้มีลักษณะที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จึงตัดสินใจใช้เชื้อดังกล่าวในการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยมันสำปะหลังเพื่อผลิต Biomass Proteinในขั้นต่อไป

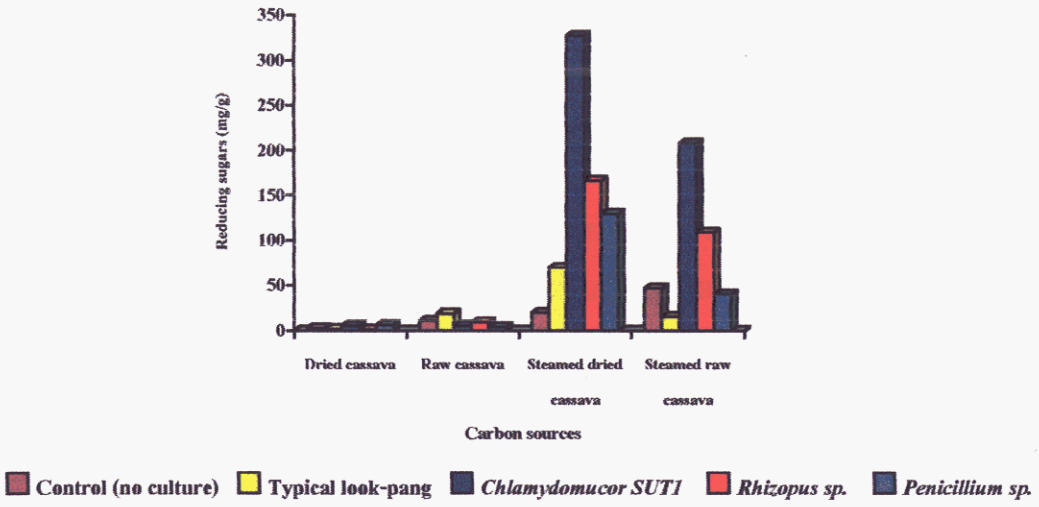
(ก) (ข)



รูปที่ 3 ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 ที่เจริญบนอาหารที่มี แป้งมันสำปะหลัง 2% เมื่อเชื้อมีอายุ 2 วัน

ข. ลักษณะรูปร่างสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การศึกษาผลของซับสเตรดที่เหมาะสมต่อกระบวนการ Saccharification



รูปที่ 4 แสดงผลของแหล่งอาหารคาร์บอนต่อกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยเปรียบเทียบกันระหว่างซับสเตรดที่แตกต่างกัน 4.ชนิดดังนี้ 1) มันเส้น 2) มันสด 3) มันเส้นนึ่ง และ 4) มันสดนึ่ง

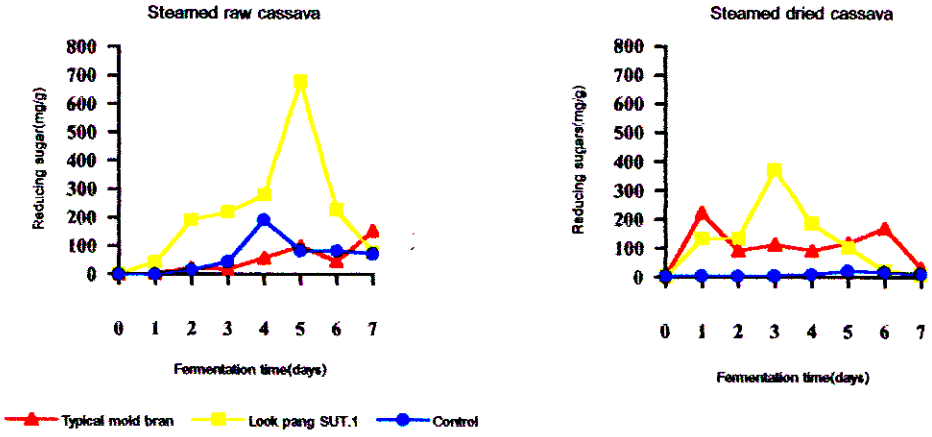
จากการศึกษาโดยนำวัตถุดิบมันสำปะหลังในรูปแบบที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ดังนี้ มันเส้น มันสด มันเส้นนึ่ง และมันสดนึ่งมาทำการหมักเปรียบเทียบกันเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนมันสำปะหลังให้เป็นแป้งโดยการทำงานของเชื้อบริสุทธิ์ *Chlamydomucor* SUT1 พบว่า การนึ่งวัตถุดิบก่อนการหมักมีอิทธิพลอย่างมากต่อความสามารถของเชื้อ ในการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยซับสเตรด ซึ่งขั้นตอนการนึ่งสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่มีในวัตถุดิบมันสำปะหลังลงได้จำนวนหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ซึ่งการฆ่าเชื้อดังกล่าวเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Chlamydomucor* SUT1 เพราะการนึ่งทำให้ปริมาณเชื้ออื่นที่จะมาแข่งขันในช่วงระยะที่เชื้อที่เราเติมกำลังปรับตัวลดลง สามารถลดภาวะแข่งขันในระยะเริ่มต้นการหมักได้ ประโยชน์ที่ได้รับอีกประการหนึ่งของการนึ่งก็คือทำให้โมเลกุลของแป้งมีขนาดสั้นลง ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ Amylase ให้ทำงานได้รวดเร็วขึ้น จากกราฟในรูปที่ 4 ซึ่งแสดงผลของชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนต่อกระบวนการ Saccharification พบว่า มันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่งแล้วให้น้ำตาลรีดิวส์สูงกว่ามันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการนึ่งอย่างชัดเจน โดยเชื้อบริสุทธิ์ *Chlamydomucor* SUT1 สามารถเปลี่ยนมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาลรีดิวส์ได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารมันเส้นนึ่งถึง 327.44 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนอาหารมันสดนึ่งวัดได้ 207.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่นแล้วมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองในขั้นต้นนี้สรุปได้ว่ามันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่งแล้วเป็นซับสเตรดที่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การเตรียมหัวเชื้อในรูปลูกแป้ง

ได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียม Dry inoculum ของเชื้อผสมระหว่างเชื้อบริสุทธิ์ *Chlamydomucor* SUT1 กับ *Candida utilis* ในรูปลูกแป้งจากลูกแป้งที่มีเชื้อ *Chlamydomucor* SUT1 เพียงชนิดเดียวโดยการ inoculate เชื้อ *C. utilis* เพิ่มเข้าไป แล้วทำการหา Total cell count เพื่อหาปริมาณเชื้อที่มีอยู่จริงในลูกแป้ง พบว่าลูกแป้งของ Singlc culturc ของเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 มีจำนวน 5.61 log CFU/กรัม และสำหรับลูกแป้งของเชื้อผสมมีเชื้อรา *Chlamydomucor* SUT1 อยู่ที่ 6 log CFU/g และมีเชื้อยีสต์ *C. utilis* อยู่ 7.58 log CFU/กรัม ตามลำดับ จากวิธีการดังกล่าวสามารถผลิตลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับลูกแป้งชาวบ้าน และการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอยู่ที่ระดับต่ำมากเป็นไปได้ว่าการปรับสูตรของส่วนประกอบต่างๆ ซึ่งรวมถึงอัตราส่วนของ เครื่องเทศที่เติมลงไปเป็นไปอย่างเหมาะสม

3.4 ประสิทธิภาพของลูกแป้ง *Chlamydomucor* SUT1 ต่อกระบวนการ Saccharification

จากการทดลองหมักมันสำปะหลังเปรียบเทียบกันระหว่างมันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่ง 2 แบบ คือ มันสดนึ่ง และมันเส้นนึ่ง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลูกแป้งมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้มันสดนึ่งเป็นซับสเตรตดังแสดงในรูปที่ 5 ปริมาณน้ำตาลริดิวส์สูงสุดถึง 680.07 มิลลิกรัมต่อกรัม หลังการหมัก 5 วัน ในขณะที่เมื่อใช้ มันเส้นนึ่ง ปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ได้รับอยู่ที่ 380 มิลลิกรัมต่อกรัม หลังการหมัก 3 วัน จากนั้นปริมาณน้ำตาลก็จะลดลงเรื่อยๆ

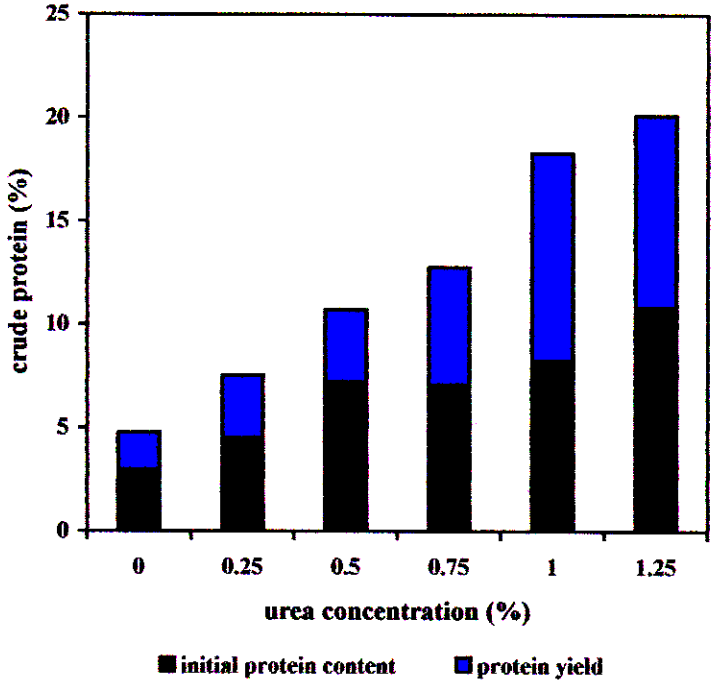


รูปที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของหัวเชื้อลูกแป้งต่อกระบวนการ Saccharification เปรียบเทียบระหว่างซับสเตรตมันสดนึ่ง และ มันเส้นนึ่ง

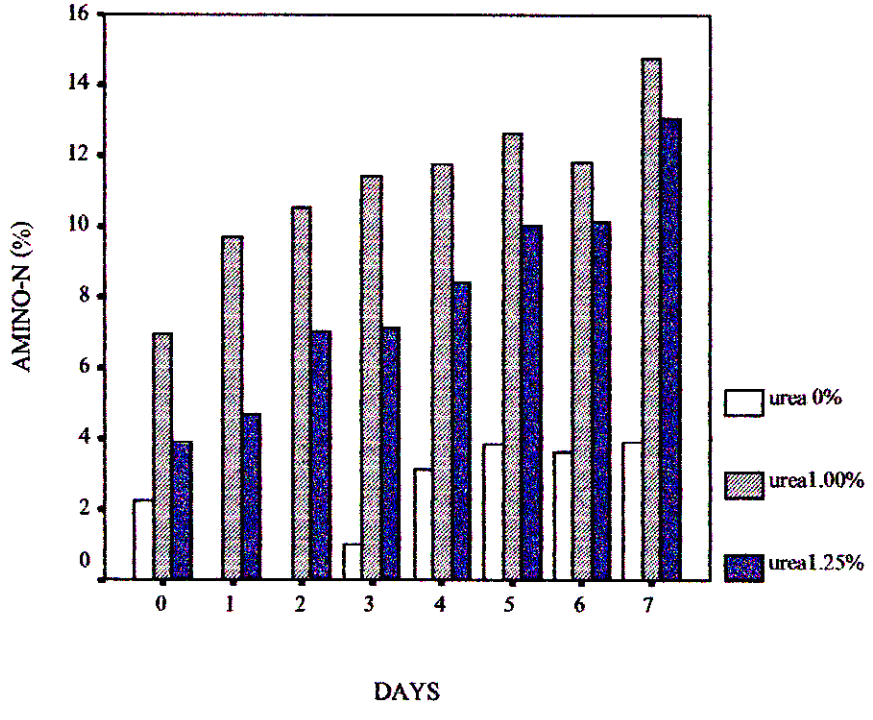
จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าลูกแป้งของเชื้อ *Chlamydomucor* SUT1 ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งอธิบายได้ว่าเมื่อเตรียม inoculumในรูปลูกแป้งซึ่งแป้งจะเป็นเหมือน carrier ที่จะช่วยป้องกันเชื้อจากสิ่งแวดล้อมทำให้เชื้อสามารถปรับตัวอย่างค่อยเป็นค่อยไป ซึ่งเป็นผลดีต่อการเจริญในระยะแรกซึ่งแตกต่างจากเชื้อบริสุทธิ์ที่อาจได้รับบาดเจ็บและตายเป็นจำนวนมากในระยะปรับตัว (Lag phase) และอีกเหตุผลหนึ่งก็คือ การที่เชื้ออยู่ในลูกแป้งเชื้อจะอยู่ในสภาพที่มีอาหารจำกัดเมื่อมันมาพบแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ก็มีการปรับตัวเจริญอย่างรวดเร็ว และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างซับสเตรด 2 ชนิดนี้ก็พบว่า มันสดนึ่งเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ดีกว่ามันเส้นนึ่ง ซึ่งอาจเป็นเพราะมันเส้นมีการปนเปื้อนของเชื้อตั้งต้นสูงกว่ามันสดมาก ถึงแม้ว่าจะนำมาผ่านการนึ่งแล้วก็ตาม เพราะการนึ่งดังกล่าวมีจุดประสงค์เพียงช่วยให้เนื้อสัมผัสของมันสำปะหลังอ่อนขึ้น เนื่องจากการที่โมเลกุลของแป้งส่วนใหญ่ถูกทำให้สั้นลงเพื่อช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วไม่ได้มุ่งที่จะกำจัดเชื้อทั้งหมด เพียงช่วยลดจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นบ้างบางส่วนเท่านั้น แต่ในขณะเดียวกันก็มีประโยชน์ต่อเชื้อที่เติมลงไปทำให้จุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถแข่งขันและเพิ่มจำนวนเป็น Dominant species ในสภาวะดังกล่าวได้ ดังนั้นมันสำปะหลังสดนึ่งจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณโปรตีนต่อไป และจากการสังเกตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองนี้ผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะสัมผัส ขาว เนื้อนิ่ม มีรสหวานและมีกลิ่นแอลกอฮอล์ คล้ายกับที่เคยมีรายงานการวิจัยมาบ้างแล้ว

3.5 การผลิต Biomass protein production โดยการหมักแบบ Solid state fermentation โดยใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมระหว่าง *Chlamydomucor* SUT1 และ *Candida utilis*

ผลจากการศึกษาขั้นต้นทำให้ทราบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ Biomass protein โดยไม่จำเป็นต้องปรับ pH ของซับสเตรดแต่อย่างใดซึ่งเป็นไปตามที่มีการรายงานมาแล้ว ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้ยูเรียเป็นแหล่งอาหารไนโตรเจนพบว่าเมื่อใช้ยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.00, 1.25% ตามลำดับได้ผลดังรูปที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ความเข้นข้น 1% ยูเรียสามารถเพิ่มปริมาณ crude protein ได้สูงขึ้นจากตั้งต้นถึง 11.37% ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีโปรตีนสูงถึง 19.45% แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ดี จำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งไนโตรเจน นั้นก็คือปริมาณยูเรียที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้จริง ดังนั้นจึงทำการทดลองต่อไปเพื่อหาปริมาณกรดอะมิโน โดยการหาอะมิโนไนโตรเจนเปรียบเทียบกันระหว่างค่าความเข้มข้นของยูเรียที่ให้ crude protein content สูงที่ ความเข้มข้น 1% กับที่ 1.25% เพื่อที่จะพิจารณาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปศึกษาในขั้นทดลองในห้องปฏิบัติการและในขั้นตอนการขยายขนาด (Scale up) ต่อไป และจากกราฟในรูปที่ 7 ทำให้ทราบว่าเชื้อสามารถนำยูเรียไปในการเพิ่ม biomass cell ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1% ยูเรีย

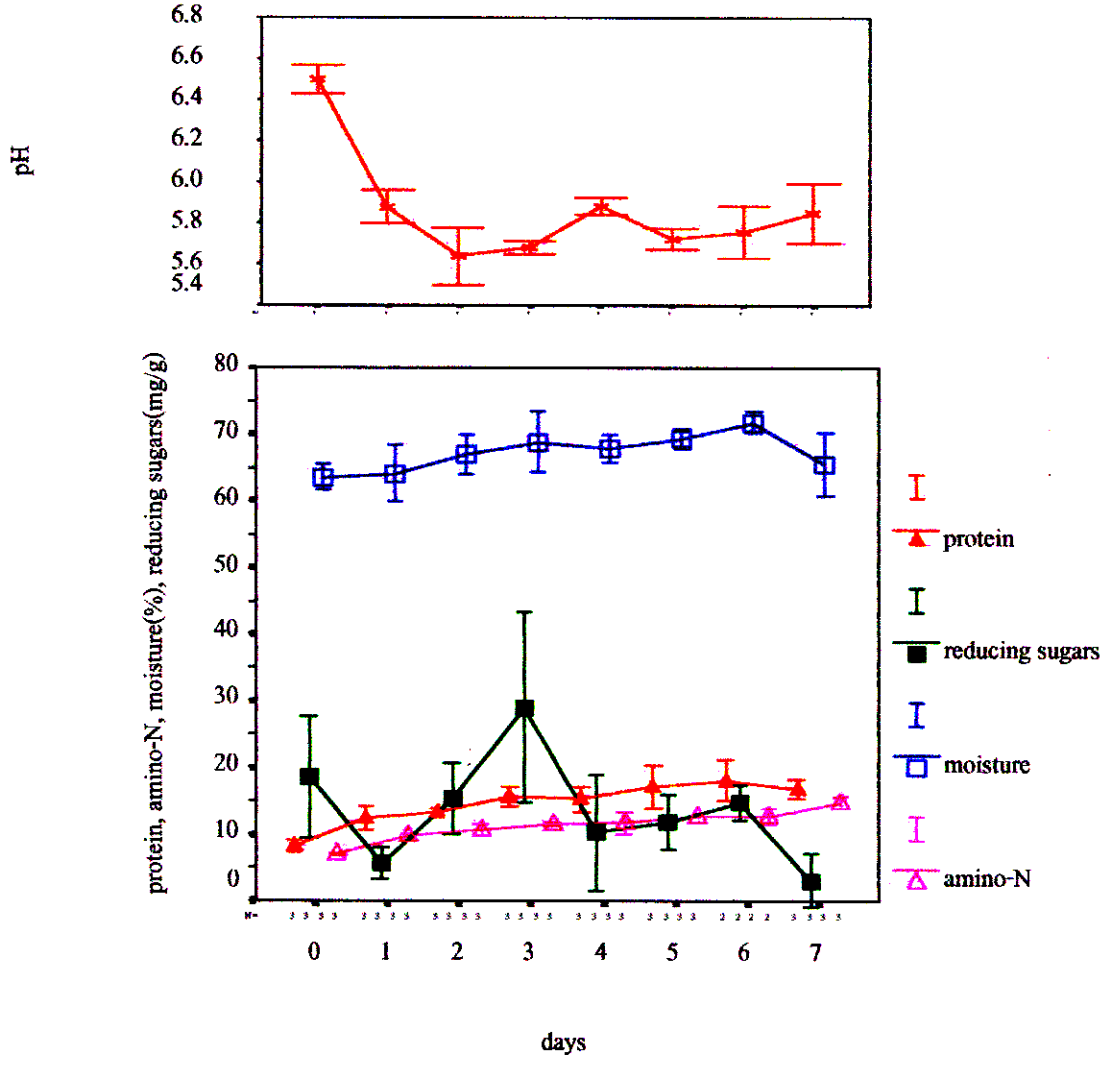


รูปที่ 6. แสดงความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในการหมักมันสดนึ่งในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ลูกแป้งของเชื้อผสม (*Chlamydomucor* SUT 1 และ *C. utilis*)



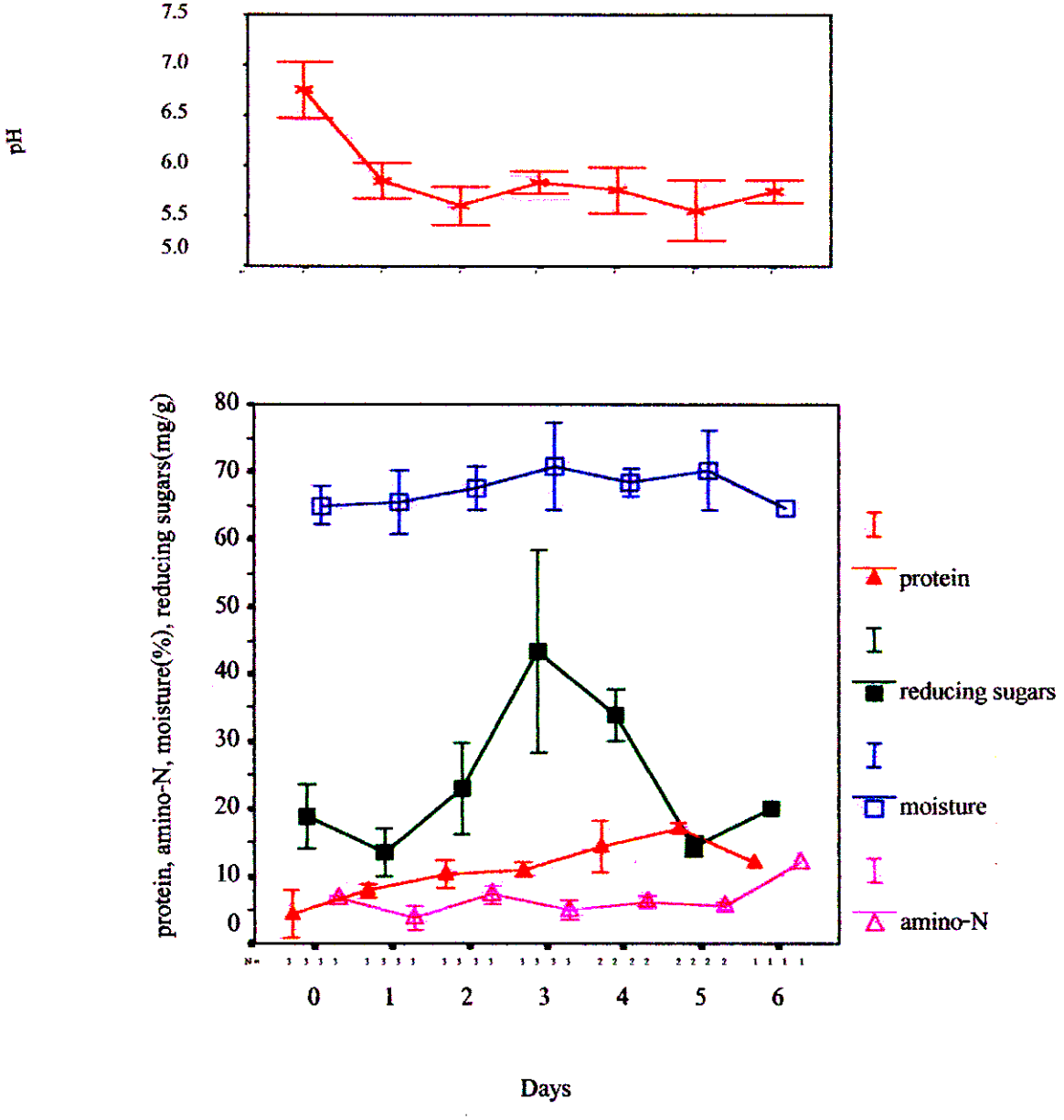
รูปที่ 7. เปรียบเทียบปริมาณการเพิ่มขึ้นของอะมิโนไนโตรเจนเมื่อใช้ยูเรียที่ระดับ 1% และที่ 1.25% ในการหมักมันสดนึ่งตามลำดับ

เมื่อทำการทดลองต่อไปโดยใช้ยูเรีย 1% ในการหมักแบบ simple process, non-controlled pH ภายใต้อุณหภูมิปรกติไม่มีการควบคุมอุณหภูมิแต่อย่างใด ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวัดความชื้นตั้งต้นของซับสเตรดได้ที่ 63% ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนสูงสุดหลังการหมักเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งที่วันดังกล่าวปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ถูกใช้ไปเกือบทั้งหมด ระหว่างกระบวนการหมัก ระดับ pH ค่อยๆลดลงและรักษาระดับอยู่ที่ 5-6 ซึ่งเป็นระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของทั้งเชื้อราและยีสต์ ความชื้นอยู่ที่ระดับ 60-75% ส่วนอุณหภูมิจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง แต่จะรักษาระดับอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง ส่วนเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วทำให้โปรตีนสูงสุดในวันที่ 6 หลังจากนั้นก็ค่อยลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับกรดอะมิโนที่ค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและมีแนวโน้มที่จะลดลงในช่วงท้ายของการหมัก (รูปที่8)



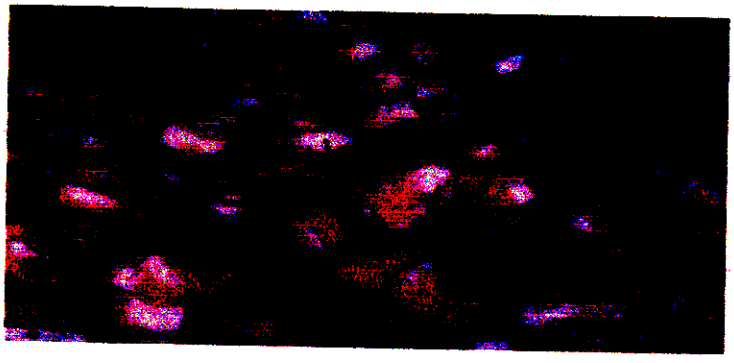
รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวส์, pH, ความชื้น, โปรตีน และ อะมิโนไนโตรเจนในการหมักมันสดนึ่งเมื่อใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ

สำหรับการหมักในถังหมักขนาด 540 ลิตร โดยทดลองเพิ่มปริมาณวัตถุดิบมันสดนึ่งจาก 50 กรัมเป็น 50 กิโลกรัม ปริมาณยูเรียที่ใช้ คือ 1% และ inoculum size ที่ 4% ซึ่งเพิ่มจาก 0.4% ถึง 10 เท่าเนื่องจากในการหมักแบบ Solid state fermentation ใน batch ขนาดใหญ่ ในสภาพ non sterile เชื้อชนิดอื่นสามารถปนเปื้อนได้ง่าย เพื่อลดปัญหาดังกล่าว จึงต้องหาวิธีการที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งเจริญได้รวดเร็ว และเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดในระยะเวลาอันสั้น มันจึงจะสามารถต่อสู้และแข่งขันกับเชื้ออื่นได้ ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้ การ inoculation เชื้อแบบ heavy inoculum ซึ่งเป็นการใส่หัวเชื้อในปริมาณสูง เป็นผลที่ทราบจากการทดลองในระยะแรกๆ ผลจากผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า วิธีการดังกล่าวสามารถลดการเจริญเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆในถังหมักลงได้มาก โดยไม่สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อราอื่นๆ และเมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ Total cell count ก็พบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนน้อยมากและเชื้อส่วนใหญ่ที่พบเป็นเชื้อในลูกแป้งของเราเป็นส่วนใหญ่ ทำให้มั่นใจได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งผสมนี้เป็น dominant species ที่เจริญซึ่งมีผลโดยตรงต่อปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้น จากรูปที่ 9 ได้ว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลง parameters ต่างๆ ในการหมักเป็นไปตามรูปแบบที่ได้จากการศึกษาขั้นต้นในห้องปฏิบัติการ แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยจนวันที่ 5 จะให้ผลผลิตสูงสุด 15.37% ซึ่งรวดเร็วขึ้นกว่าเดิมถึงแม้ว่าปริมาณโปรตีนจะมีเปอร์เซ็นที่ลดลงจากการหมักในห้องปฏิบัติการก็ตามแต่ก็ให้ผลในระดับเป็นที่ยอมรับได้ การที่ปริมาณโปรตีนเพิ่มอย่างรวดเร็วเป็นไปได้ว่ามีผลโดยตรงจากการใช้เทคนิค heavy inoculum ส่วนน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดในวันที่ 3 และลดลงซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของโปรตีน อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะมิโนก็สูงสุดในวันสุดท้ายของการหมักก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตากแห้ง เพื่อนำไปศึกษาโดยการแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป รูปที่ 10 แสดงเห็นการเปลี่ยนแปลงของมันสดนึ่งก่อนและหลังการหมัก ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลิตผลที่ได้หลังการหมักมีลักษณะสัมผัสที่ยอมรับได้ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไป

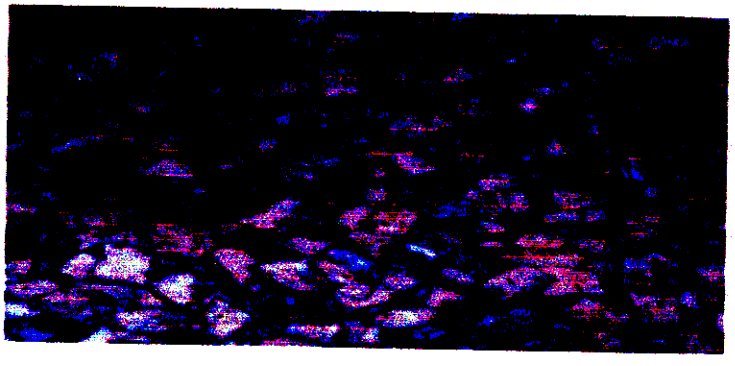


รูปที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวส์ pH ความชื้น โปรตีน และ อะมิโนไนโตรเจนในการหมักมันสดนึ่งเมื่อใช้ลูกแป้งของเชื้อผสมที่พัฒนาขึ้นในถังหมักขนาด 540 ลิตร

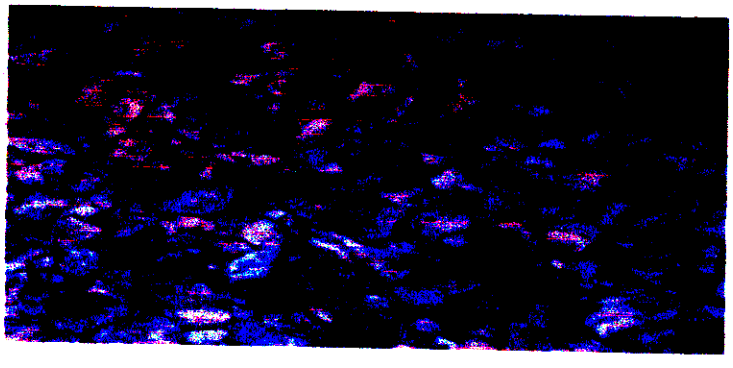
ก



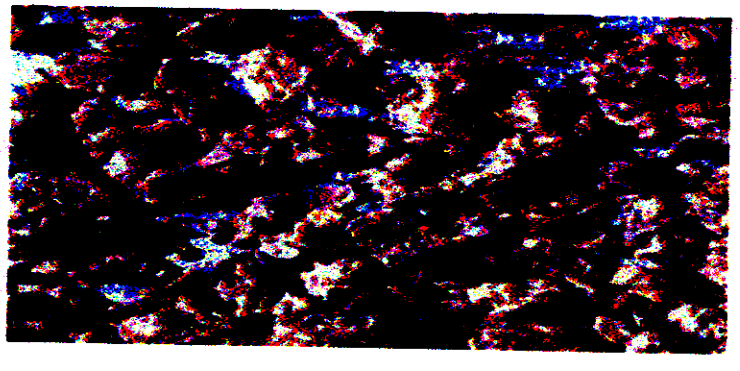
ข



ค



ง



รูปที่10 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะมันสำปะหลังในการหมักแบบ Solid state fermentation ในถังหมักขนาด 540 ลิตร รูป ก) มันสดนึ่งก่อนการหมัก ข) มันสดนึ่งในวันที่ 2 ของการหมัก ค) วันสุดท้ายของการหมัก และ ง) หลังการตากแดดจนแห้งจุดประสงค์เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ สามารถเปลี่ยนแปลงผลผลิตทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้ง เช่นมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรภายในประเทศ ไปเป็นผลผลิตใหม่ที่มีมูลค่าสูงขึ้นได้ โดยการศึกษาครั้งนี้เราสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อะมิเลส ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการ Saccharification ที่จะเปลี่ยนแป้งที่มีในมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล ในการผลิตเพิ่ม biomass ในการอาหารเพิ่มปริมาณโปรตีน

โดยงานวิจัยนี้เราสามารถพัฒนาและผลิต Dry inoculum ในรูปลูกแป้งของเชื้อผสมระหว่าง *Chlamydomucor* SUT 1 และ *C. utilis* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนมันสำปะหลังให้มีปริมาณสูงขึ้นถึง 18.3% และ 15.3% ในระดับห้องปฏิบัติการและเมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 540 ลิตรตามลำดับ ถึงแม้ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นจะไม่แตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมามากนัก (Yuthavong และ Gibbons, 1994; Zvauya และ Muzando, 1994) แต่วิธีการหมักที่ได้ศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากที่เคยมีการวิจัยมามากตรงที่การผลิตเป็นแบบ Solid state fermentation ซึ่งเป็นแบบ Non aseptic condition ที่ไม่มีการควบคุม pH ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ โดยจำเป็นต้องปรับความชื้นของซับสเตรตเริ่มต้น อีกทั้งใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกเช่นยูเรียซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้มาก จึงน่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาใช้จริงต่อไป

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2538. การแปรรูปมันสำปะหลังเพื่อสิ่งแวดล้อม. วารสารอาหาร 25 (4):231-237

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2520. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมัก และเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุสาหกรรม, สำนักงาน, 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง(ม อก. 3-2526). กรุงเทพมหานคร: กระทรวงอุตสาหกรรม.

AOAC,1990. **Official methods of analysis**. 14th Ed. Assosiation of Official Analytical Chemists. Arlington. Virginia.

Balagopalan, C., Podmaja, G., Nanda, S. K. and Moorthy S. N. (1988). **Cassava in Food, Feed, and Industry** (pp.13). Boca Raton, CRC Press Inc.

Bernfeld, P.(1951). In Nord, F.F.(ed) ,**Advances in enzymology**.(pp. 379-428), Vol 12. New York.

Braumann A., Keleke S., Malonga M., Miambi E., and Ampe F. (1996). Microbiological and biochemical characterizaton of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for Foo-Foo (Cassava flour) Production. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (8): 2854-2858.

Charoensiri, K., De-eknmkul C., Assavaning A., Vravinit S. and Bhumiratana A.. (1990). Biomass protein produce from cassava using *Cephalosporium eichhorniae* 152 grown in an air-lift fermentor. **Microbial Utilization of Renewable Resources**. 7: 330-335.

Charoensiri K. et al. (1990). Thailand work on starch biotechnology: **Biotechnology for development**. (pp.122-124).

Cock James H. (1982). Cassava: a basic energy source in the tropics. **Science**. 218(19):155-218.

Daubresse P., Ntibashirwa S., Gheysen A. and Meyer J.A. (1987). A process for protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation in rural conditions. **Biotechnol. Bioeng.** XXIX: 962-968.

Galliard, T. (1987). Critical Reports on Applied Chemistry, **Starch: Properties and Potential**, pp.122-125, Vol.13, Chichester, John Wiley&Sons.

Graham Donald C.W., Steinkraus Keith H. and Hackler L.R. (1976). Factors affecting production of mold mycelium and protein in synthetic media. **Appl. Environ. Microbiol.** 32 (3): 381-387.

Helmut, U. (1998). **Industrial enzymes and their applications/ Helmut Uhlig; Translated and update by Elfriedem. Linsmaier.** New York:J. Wiley.

Hosobuchi M., and Yoshikawa H. (1999). Scale up of microbial processes: **Manual of industrial microbiology and biotechnology** (pp. 236-239). Washington D.C.:ASM Press.

James, C. S. (1995) **Analytical chemistry of foods.** London: Blackie A&P.

Khor G.L., Alexander J.C., Lumsden J.H. and Losos G.J. (1977). Safety evaluation of *Aspergillus fumigatus* grown on cassava for use as an animal feed. **Can. J. Comp. Med.** 41: 428-434

Lonsane, B. K.& Ramesh, M. (1990). Production of bacterial thermostable α-amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Adv. Appl. Microbiol.**, 35: 1-47.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J.Randall (1951). Protein measurement with Folin Phenol reagent . **J. Biol. Chem.** 193:265-275.

Reade A.E., Gregory K.F. (1975). High temperature Production of protein. Enriched feed from cassava by fungi. **Appl. Microbiol.** 30 (6): 897-904.

Sato K., and Sudo S. (1999). Small-scale solid state fermentations: **Manual of industrial microbiology and biotechnology** (pp. 61-79). Washington D.C. :ASM Press.

Soccol C.R., Marin B., Raimbault M. and Lebeault J-M. (1994) Breeding and growth of Rhizopus in raw cassava by solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41: 330-336.

Sreeramamurthy, V.V. (1945). Investigations on the nutritive value of tapioca. **Ind. J. Med. Res.**, 33, 229.

Tani Y., Vongsuvanleri V. and Kumnuanta J. (1986). Raw cassava strach-digestive Glucoamylase of *Aspergillus* sp. N-2 isolated from cassava chips. **J. Ferment. Technol.** 64 (5): 405-410.

Tan K.H., Feboguson L.B., and Cariton C. (1984). Conversion of cassava starch to biomass, carbohydrate, and acids by *Aspergillus niger*. **J. Appl. Biochem.** 6: 80-90.

Yuthavong Y. and Gibbons G. C. (1994). **Biotechnology for development: principles and practice relevant to developing countries** (pp. 122-124), ASEAN Subcommittee on Biotechnology.

Zeikus, G., and Johnson, E.A. (1991). Mixed cultures in biotechnology (pp. 247-252), McGraw-Hill, Inc.

Zvauya, R., and Muzando, M.I. (1994). Some factors affecting protein enrichment of cassava flour by solid state fermentation. **Lebensmittel. Wissenschaft und-Technologie.** 27(6): 590-591.

ภาคผนวก ก

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Cassava starch agar

แป้งมันสำปะหลัง	20	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม

ปรับ pH เป็น 6 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

1.2 Raw cassava medium

มันเส้น	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม

ปรับ pH เป็น 5 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

1.3 Cassava broth สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมอะมิเลส (Amylase activity)

มันเส้น	80	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$CaCO_3$	2.5	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือกโดยการทดสอบ Saccharification ของแป้ง

วิธีการ

1) ถ่ายเชื้ออายุ 3 วันปริมาณเท่า ๆ กัน (1 ml/อาหาร 1 flask) ลงในอาหารเหลวที่มีมันเส้นบด 8% ปริมาณ 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร (ทุกเชื้อทำ 2 ซ้ำ)
2) นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง
3) นำอาหารเหลวที่ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกเอาเซลล์และตะกอนมันเส้นบดออกที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที น้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นส่วนของ crude enzyme นำไปหา Amylase activity

หมายเหตุ แช่เย็นตัวอย่างก่อนนำไปหา Amylase activity

3. การหากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ Alpha amylase และ Beta amylase activity

สารเคมีที่ใช้ (Bernfeld,1951)

1) น้ำแป้ง 1% ใน 0.02 M Phosphate buffer, pH6.9 (สำหรับ Alpha amylase)
2) น้ำแป้ง 1% ใน 0.016 M Sodium acetate buffer, pH4.8 (สำหรับ Beta amylase)
3) น้ำแป้ง 1% ใน 0.05 M Sodium acetate buffer, pH4.5 (สำหรับ Glucoamylase)
4) crude enzyme (ส่วนของน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเอาเซลล์ออกแล้ว)

วิธีการ

1) ปีเปตสารละลาย 1 หรือ 2 ขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์ที่ต้องการศึกษามา 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปอุ่นใน water bate 30 องศาเซลเซียส แล้วเติม crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ใน water bath 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) 0.5 ml แล้วต้มต่อ 5 minจะได้เป็นค่า RS_1
2) ปีเปตสารละลาย 1 หรือ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบ เติม crude enzyme 0.5 มิลลิลิตรและ สารละลาย DNS reagent 0.5 ml นำไปต้มน้ำให้เดือดประมาณ 5 นาที จะได้เป็นค่า RS_0

การคำนวณ

Amylase activity = $RS_1 - RS_0$

Amylase activity ที่ได้แสดงเป็นหน่วยโดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งเป็นกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.9 และ 4.8 สำหรับ Alpha amylase และ Beta amylase ตามลำดับ

4. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยวิธีการ DNS

การเตรียม DNS Solution เริ่มจากการผสม

1. น้ำกลั่น	1,416	มิลลิลิตร
2. 3, 5-dinitrosalicylic acid	10	กรัม
3. Sodium hydroxide	19	กรัม

ละลายทั้งหมดให้เข้ากันแล้วจึงเติม

4. Potassium sodium tartate	306	กรัม
5. Phenol (หลอมเหลวที่ 50°C)	7.6	กรัม
6. Sodium metabisulfite	8.3	กรัม

เก็บสารละลาย DNS ที่ได้ในขวดสีชา

ขั้นตอนการวิเคราะห์

นำสารละลายของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมา 1 มิลลิลิตร.ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS อยู่ 3 มิลลิลิตร.นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

ง. การหาปริมาณโปรตีน (True Protein) โดยใช้ Folin-Ciocalteau reagent ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมีที่ใช้

1) Alkaline copper solution ใช้ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) Na_2Co_3 ที่ละลายใน 0.1 NaOH, 1% $CuSO_4.5H_2O$ และ 2% Na-K tartrate ผสมกันในอัตราส่วน 100:1:1 เตรียมก่อนที่จะใช้เท่านั้น เพราะส่วนผสมนี้อยู่ได้นาน 2-3 ชม.เท่านั้น
2) Phenol reagent (1 N Folin Ciocalteau reagent)
3) มาตรฐานโปรตีนใช้ Bovine serum albumin

วิธีการ

1) ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.1 ml ใส่ในหลอดทดสอบ ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 20-160 ไมโครกรัมต่อ 0.5 ml
2) เติม Alkaline copper solution 3 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้ผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3) เติม 1N folin Ciocalteu reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสีชัดเจนเป็นเวลา 30 นาที

4) blank ใช้น้ำแทนตัวอย่าง นำไปวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

โปรตีนได้จากการวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl ตาม AOAC ,1990

การคำนวณ

% Nitrogen = (ml of titrant×Normality of NaOH ×14×100) / (g of sample×1,000)

% Protein = % Nitrogen×6.25

6 ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน (ตามวิธีใน **มอก. 3-2526**)

ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน คือ ผลต่างคิดเป็นกรัมระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตเจน (formaldehyde nitrogen) กับ อัมโมเนียคัลไนโตรเจนในตัวอย่าง

1. ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

1.1) เครื่องมือ เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.2) สารละลายที่ใช้

1.2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

1.2.2 สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 35% ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 โดยการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.3) วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 0.5 กรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 10 มิลลิลิตร แล้วติเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9

1.4) วิธีการคำนวณ

คำนวณค่าฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนได้จากสูตรดังนี้

$$X = 14YM$$

เมื่อ X คือ ปริมาณของฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน ในตัวอย่าง (กรัม)

Y คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการติเตรต (มิลลิลิตร)

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นนอร์มอล

2. อัมโมเนียคัลไนโตรเจน

2.1 สารเคมีและสารละลายที่ใช้

1.1.1 แมกนีเซียมออกไซด์

1.1.2 กรดบอริก 4%

1.1.3 สารละลายกรดไฮโดรครอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

1.1.4 เมทิลเรด- โบรโมครีวอลกรีน อินดิเคเตอร์ (เมทิลเรดและโบรโมครีซอลกรีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักในอัตราส่วน 1:5)

2.2 วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 0.5 กรัมเจือจางด้วยน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่น เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 1.5 กรัม แล้วกลั่นอัมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในขวดที่มีบอริก 25 ml และมีเมทิลเรด-โบรไมครีซอลกรีนอินดิเคเตอร์ 3-5 หยด จนกระทั่งปริมาตรของสารละลายในขวดกลั่นเหลือเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม ติเตรตอัมโมเนียที่เกิดขึ้นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู

2.3 วิธีคำนวณ

คำนวณหาอัมโมเนียคัลไนโตรเจนได้จากสูตรดังนี้

$$X=5.6YM$$

เมื่อ X คือ ปริมาณของอัมโมเนียคัลไนโตรเจนในตัวอย่าง (กรัม)

Y คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการติเตรต

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นนอร์มอล

7. การทำลูกแป้งของเชื้อผสม *Chlamydomucor* SUT 1 และ *C. utilis*

วิธีการเตรียมเชื้อ

1) Subculture ลงบน Slant เพื่อให้ได้เชื้อที่มีอายุ 3 วัน
2) ทำการเจือจางโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำ suspension แล้วดูดมาใช้ตามปริมาณที่ต้องการ

วิธีการทำลูกแป้ง

1) เตรียมข้าวเจ้าโดยการแช่น้ำ 3 ชั่วโมงและทำการเปลี่ยนน้ำทุก 1 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแลคติก และ *Bacillus* spp. ซึ่งอาจทำให้ลูกแป้งด้อยคุณภาพ หลังจากนั้นนำไปโม่ด้วย Blender แล้วทำให้แห้งโดยกรองด้วยผ้าขาวบาง

2) บดสมุนไพรที่แห้งแล้วให้ละเอียด ซึ่งมีทั้งหมด 10 ชนิดดังนี้คือ ชะเอม อบเชย เจตมูลเพลิง กานพลู กระชาย กระเทียม ขิง ข่า ดีปลี พริกไทย สูตรที่ใช้คือ 1 กรัมต่อข้าวเจ้า 500 กรัม เพราะฉะนั้นจะใช้ 0.4 กรัมต่อแป้ง 200 กรัม
3) ผสมแป้งกับสมุนไพรให้เข้ากันโดยเติมน้ำเพื่อให้ปั้นเป็นก้อนได้ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาณน้ำที่ใช้นั้นกำหนดไม่ได้แน่นอนขึ้นกับแป้งที่ใช้ เติมเชื้อบริสุทธิ์ Mold SUT1 ซึ่งอยู่ในรูปสารละลาย 3มิลลิลิตร ต่อแป้งข้าวเจ้า 200 กรัม
4) นวดแป้งจนเหนียวแล้วหมักแป้งไว้ 2-3 ชั่วโมง ก่อนนำมาปั้นเป็นก้อน แล้วกดให้แบนเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปตากลมจนแห้ง
5) หลังจากลูกแป้งแห้งดีแล้วให้เก็บในกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ถุงพลาสติกเก็บในตู้เย็น 8 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเป็นกล้าเชื้อได้อย่างน้อยที่สุด 6 เดือน ควรหมั่นนำออกมาตากแดดเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา
6) สำหรับการพัฒนาเป็นลูกแป้งของเชื้อผสมทำได้โดยการนำลูกแป้งของ single culture ที่ได้มาต่อเชื้อแล้วดำเนินการตามวิธีการเดิมก็จะได้ลูกแป้งของเชื้อผสม *Chlamydomucor* SUT 1 และ *C. utilis*

8. การทำข้าวหมาก

วิธีการ

1) นำข้าวเหนียวนึ่งสุกแล้วเอาขึ้นจากหวด แล้วผึ่งในกระด้งไว้พอหายร้อน
2) นำข้าวเหนียวไปล้างน้ำให้เม็ดข้าวแยกจากกันสัก 2 น้ำ
3) สงขึ้นจากน้ำ นำมาพึ่งพอหมาด ๆ แล้วนำลูกแป้งบีบใส่ข้าวเหนียวคลุกเคล้าให้เข้ากัน ลนไฟที่ก้นหม้อให้พออุ่น นำข้าวเหนียวที่ผสมไว้ใส่ลงไป กดให้แน่น
4) ปิดไว้ 2-3 วัน ถ้าอากาศร้อน 2 วันก็เป็นข้าวหมาก อย่าเก็บนานกว่านั้นเพราะจะทำให้เชื้อราชนิดอื่นเจริญขึ้นได้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 แสดงขนาด Clear zone บน starch agar ในการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบขั้นต้น

ลำดับที่	Source	Isolate no.	Clear Zone(mm.)	ชนิดของเชื้อ
1	กากมันสำปะหลัง	2	2	รา
		4	10	รา
3		5	10	รา
4		6	9	แบคทีเรีย
5		7	1	รา
6		8	1	แบคทีเรีย
7		9	2.5	แบคทีเรีย
8		11	2.0	รา
9		13	0.8	แบคทีเรีย
10		14	2	แบคทีเรีย
11		19	7	แบคทีเรีย
12		20	6	แบคทีเรีย
13		23	1.1	รา
14		24	1.4	ยีสต์
15		25	1.2	แบคทีเรีย
16		29	1.0	แบคทีเรีย
17		60	3.0	ยีสต์
18		64	1.0	ยีสต์
19		68	0.6	แบคทีเรีย
20		69	19.4	ยีสต์
21		72	2.3	แบคทีเรีย
22		73	2.5	รา
23		79	0.6	แบคทีเรีย
24		85	11	แบคทีเรีย
25		94	11	แบคทีเรีย
26		105	1.2	แบคทีเรีย
27	แป้งสาเก cake	AA	8.1	ยีสต์
28	ลูกแป้งลาว	BB	4.6	ยีสต์
29		CC	2.8	ยีสต์
30	ข้าวหมากรสสุคนธ์	1A	3.0	ยีสต์
31		1B	3.0	ยีสต์

ลำดับที่	Source	Isolate no.	Clear Zone(mm.)	ชนิดของเชื้อ
32	ข้าวหมากไทย	2A	5.0	ยีสต์
33	ลูกแป้งไทย	3A	21.0	ยีสต์
34		4A	19.0	ยีสต์
35		G	20.0	ยีสต์
36		มันหวาน	36.0	รา
37	มันสดขึ้นรา	มันดิบ	32.9	รา

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch agar ของเชื้อทั้งหมด 27 Isolates ที่แยกได้จากกากมันสำปะหลัง ข้าวหมาก รวมทั้งลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ และผ่านการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบขั้นต้นแล้ว

No.	Source	Isolate no.	ลักษณะโคโลนีบน Starch agar	ชนิดของเชื้อ
1	กากมันสำปะหลัง	2	กลมขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ผิวด้าน ติดผิววุ้น	รา
2		4	สร้างเส้นใยและสปอร์สีเขียว	รา
3		5	สีดำ รอบ ๆโคโลนีเป็นสีเหลือง สร้างสปอร์และเส้นใย	รา
4		6	สีขาวขุ่น วงกลมขนาดเล็ก	แบคทีเรีย
5		7	สีส้มอ่อนมีเส้นใยเจริญติดผิววุ้น	รา
6		8	โคโลนีสีเขียว ผิวเป็นมัน	แบคทีเรีย
7		9	โคโลนีสีเหลืองผิวเป็นมัน	แบคทีเรีย
8		11	กลุ่มเส้นใยสีขาว สปอร์สีดำ	รา
9		13	สีส้มมีเส้นใยติดหน้าอาหารวุ้น	แบคทีเรีย
10		14	สีขาวขุ่น ผิวด้าน	แบคทีเรีย
11		19	สีครีมขนาดเล็ก ผิวด้าน	แบคทีเรีย
12		20	สีขาว ผิวด้าน	แบคทีเรีย
13		23	สร้างเส้นใยสีขาว มีสปอร์สีดำ	รา
14		24	กลมขนาดปานกลางมีสีขาวขุ่น	ยีสต์
15		25	โคโลนีสีส้มขุ่น	แบคทีเรีย
16		29	สีขาวขุ่นขนาดใหญ่ ริมเป็นคลื่น	แบคทีเรีย
17		60	สีขาวขุ่นผิวหน้าด้าน	ยีสต์
18		64	สีครีมขนาดเล็กผิวหน้าเป็นมัน	ยีสต์
19		68	สีเหลืองอ่อน ผิวหน้าเป็นมัน	แบคทีเรีย
20		69	ขนาดใหญ่สีขาวด้าน	ยีสต์
21		72	สีเหลืองอ่อนเป็นเมือก	แบคทีเรีย

No.	Source	Isolate no.	ลักษณะโคโลนีบน Starch agar	ชนิดของเชื้อ
22		73	สีส้มอ่อนเจริญติดหน้าวุ้น มีเส้นใย	รา
23		79	สีเหลืองอ่อนผิวหน้าเป็นมัน	แบคทีเรีย
24		85	สีเหลืองอ่อนขอบเป็นหยัก ด้าน	แบคทีเรีย
25		94	สีครีม ขอบเป็นหยัก ด้าน	แบคทีเรีย
26		105	สีเหลืองอ่อน ผิวเป็นมันใส	แบคทีเรีย
27	แป้งสาเก cake	AA	ขนาดเล็กมากสีขาวครีม	ยีสต์
28	ลูกแป้งสาว	BB	ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ผิวมันวาว	ยีสต์
29		CC	ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ผิวด้าน	ยีสต์
30	ข้าวหมากรสสุคนธ์	1A	สีครีม ผิวเยิ้ม	ยีสต์
31		1B	สีครีม เยิ้ม	ยีสต์
32	ข้าวหมากไทย	2A	สีขาวขุ่น ผิวด้าน	ยีสต์
33	ลูกแป้งไทย	3A	สีขาว ปูดนูนตรงกลาง ลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวบริเวณผิวหน้า	ยีสต์
34		4A	สีครีม มันวาวกลม แบน	ยีสต์
35		G	สีขาวนูนปูดตรงกลาง กลมขนาดใหญ่	ยีสต์
36		มันหวาน	กลุ่มโคโลนีฟู เส้นใยบางมาก ไม่มีสี	รา
37	มันสดขึ้นรา	มันดิบ	กลุ่มโคโลนีฟู สีขาวขุ่น	รา

ตารางที่ 3 ผลการยืนยันชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการย่อยแป้งขั้นต้น โดยการย้อมสีแกรม

Isolate no.	รูปร่าง	ขนาด(μm)	การติดสีแกรม	ชนิดของเชื้อ
6	ท่อนต่อกันเป็นสายยาว	0.3×0.5	G+	แบคทีเรีย
8	กลม	0.1-0.3	G-	แบคทีเรีย
9	ท่อนต่อกันเป็นสายยาว	0.3×0.5-0.7	G-	แบคทีเรีย
13	ท่อนสั้น	0.3×0.5	G-	แบคทีเรีย
14	ท่อนต่อกันเป็นสายยาว	0.3×0.5	G-	แบคทีเรีย
19	ท่อนต่อกันเป็นสายยาว	0.3×0.5	G+	แบคทีเรีย
20	ท่อนต่อกันเป็นสายยาว	0.1-0.3×0.4-0.5	G-	แบคทีเรีย
24	กลม	0.7-1.0		ยีสต์
25	กลม	0.1-0.3	G-	แบคทีเรีย
29	ท่อนสั้น	0.5×1	G+	แบคทีเรีย
60	ท่อนสั้น	1-3×6-7		ยีสต์
64	กลม	2-7		ยีสต์
68	กลม	0.1-0.3	G-	แบคทีเรีย
69	กลม	3-7		ยีสต์
72	กลม	0.5-1	G-	แบคทีเรีย
79	กลม	0.1-0.3	G-	แบคทีเรีย
85	ท่อนสั้น	0.1-0.3×0.7-1	Gvariable	แบคทีเรีย
94	ท่อนสั้น	0.1-0.3×0.5-1	Gvariable	แบคทีเรีย
105	ท่อนสั้น	0.1-0.3×0.5-1	G-	แบคทีเรีย
AA	รูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่กลม	2		ยีสต์
BB	กลม	2-5		ยีสต์
CC	รูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งกลมและรี	5-7		ยีสต์
1A	วงกลมและวงรี	2-3		ยีสต์
1B	กลมรี	4-5		ยีสต์
2A	กลมรี	2-3		ยีสต์
3A	รูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งกลมและรี	5-7		ยีสต์
4A	รูปร่างไม่แน่นอน ขนาด	2-3		ยีสต์
G	กลมรี	3-5		ยีสต์

สรุป แบคทีเรียที่ได้ทดสอบว่าย่อยแป้งได้ในขั้นต้นมี 14 isolates :

Coccobacilli, G-	5	isolates
Rod, Gram positive	3	isolates
Rod, Gram negative	6	isolates

ตารางที่ 4 แสดงประสิทธิภาพการย่อยข้าวเหนียวของเชื้อแต่ละ Isolate เปรียบเทียบกับลูกแป้งชาวบ้าน

Isolate no.	ระยะเวลาของการบ่มเชื้อ		
	1วัน	2วัน	3วัน
2	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 มีการเจริญของเชื้อแต่ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง
4	1,2 เกิดการยุบตัวเล็กน้อย	1. ยุบตัวมาก 2. ยุบตัวเล็กน้อย	1. ยุบตัวมีน้ำมาก กลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก 2.ไม่เปลี่ยนแปลง
5	1,2 ยุบตัวไม่มีกลิ่น	1,2 ยุบตัวไม่มีกลิ่น	1,2 เชื้อเจริญทั่วถึงมีกลิ่นแอลกอฮอล์
6	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก	1,2 ยุบตัว ปริมาณน้ำมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
7	1,2 ยุบตัวปานกลาง มีน้ำเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมากกลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
8	1,2 ยุบตัว 10%มีน้ำที่ก้น plate	1,2 ยุบตัวมากขึ้น น้ำมากข้น	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นบูด
9	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย น้ำเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
11	1,2 ยุบตัวมีกลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก	1,2 ปริมาณน้ำมากขึ้นเชื้อเจริญทั่งถึง	1,2 มีปริมาณน้ำมากขึ้น มีกลิ่นกรดเล็กน้อย
13	1 ยุบตัวค่อนข้างมาก มีน้ำที่ก้นจาน 2ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	1,2 ยุบตัวมากขึ้น ปริมาณน้ำมากขึ้น	1,2 ปริมาณน้ำมาก มีกลิ่นค่อนข้างดี
14	1 มีการยุบตัวเล็กน้อย มีน้ำ กลิ่นดี 2ไม่เปลี่ยนแปลง	1 ยุบตัว ปริมาณน้ำมากขึ้น กลิ่นดี 2ไม่เปลี่ยนแปลง	1.ยุบตัวมาก กลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก 2.ไม่เปลี่ยนแปลง
19	1,2 ยุบตัว10%	1 ยุบตัวแต่ไม่มีน้ำ 2 ยุบตัวและมีน้ำที่ก้นจาน	1.ยุบตัวแต่ไม่มีน้ำ 2.ยุบตัวเล็กน้อย มีน้ำมากขึ้น
20	1,2 ยุบตัว 10%มีน้ำกลิ่นคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก น้ำมาก กลิ่นคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก น้ำมาก กลิ่นคล้ายข้าวหมาก
23	1.เกิดการยุบตัวเล็กน้อย 2.ไม่เปลี่ยนแปลง	1.ยุบตัวมากขึ้นเล็กน้อย 2.ยุบตัวเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวเท่าเดิมไม่เปลี่ยนแปลง
24	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 เชื้อเจริญแต่ข้าวเหนียวไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง
29	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย มีกลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวขึ้นเล็กน้อย มีกลิ่นบูด	1,2 ยุบตัวเท่าเดิม กลิ่นบูดมากขึ้น
60	1.ยุบตัวเล็กน้อย กลิ่นบูด มีน้ำเล็กน้อย 2. ยุบตัว 10%กลิ่นบูด	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก 50% กลิ่นบูด	1,2 ยุบตัวมากน้ำมาก

ระยะเวลาของการบ่มเชื้อ

Isolate no.	1วัน	2วัน	3วัน
64	1.ยุบตัว มีน้ำมาก กลิ่นดี 2.ยุบตัว ปริมาณน้ำมาก กลิ่นดี	1.ยุบตัวมากขึ้นน้ำ50%กลิ่นคล้ายข้าวหมาก 2.ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นคล้ายข้าวหมาก
68	1,2 ยุบตัว10%กลิ่นข้าวบูด	1,2 ยุบตัวมากขึ้น ปริมาณน้ำมาก50 % กลิ่นบูด	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
69	1,2 เกิดการยุบตัวค่อนข้างมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นแอลกอฮอล์ค่อนข้างแรง	1,2 ยุบตัวมาก 30%ปริมาณน้ำมาก50 % กลิ่นคล้ายข้าวหมาก
72	1,2 มีการยุบตัวเล็กน้อย สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อ	1,2 ยุบตัวมากขึ้น ปริมาณน้ำมากขึ้น	1,2 ยุบตัวมาก กลิ่นดี
73	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย มีน้ำที่ก้นจานอาหารเล็กน้อย กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก มีน้ำมาก กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
79	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลงแต่มีการเจริญของเชื้อ	1 ยุบตัวเล็กน้อย มีน้ำเล็กน้อย 2 ยุบตัว มีน้ำเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมากขึ้น
85	1,2 ยุบตัว50% ปริมาณน้ำเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวมาก มีน้ำ30%	1,2 ยุบตัวมาก น้ำมาก
94	1,2 ยุบตัว10% มีน้ำเกิดขึ้น	1,2 ยุบตัวมากขึ้น ปริมาณน้ำ30%	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
105	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก
3A	1,2 สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อสีขาว บนผิวหน้าอาหาร กลิ่นข้าวบูด	1,2 ยุบตัวน้อยมาก5 %ไม่ค่อยมีน้ำที่ก้นจานอาหาร	1,2 กลิ่นแอลกอฮอล์ มีน้ำเล็กน้อย ไม่ค่อยยุบตัว
G	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย กลิ่นดี มีน้ำเล็กน้อย กลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย
มันหวาน	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ยุบตัว20 % มีน้ำที่ก้นจานอาหาร กลิ่นหอมข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก70 %เป็นข้าวหมาก
มันดิบ	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ไม่ยุบตัว สังเกตเห็นมีราสีขาวปุยเหมือนสำลี เจริญเต็มจานอาหาร ไม่มีน้ำ	1,2 ไม่ยุบตัว เชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของ Type Culture Strains ในการย่อยข้าวเหนียว

Isolate no.	ระยะเวลาของการบ่มเชื้อ		
	1วัน	2วัน	3วัน
ร14 (คล้าย Rhizopus)	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย มีการเจริญของเชื้อ สร้างสปอร์สีเทา และเส้นใย มีน้ำเล็กน้อย กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย มีน้ำเล็กน้อย ราเพิ่มเส้นใยเจริญเต็มจานอาหาร กลิ่นหอมข้าวหมาก	1,2 ราเจริญสร้างเส้นใย และสปอร์ปกคลุมผิวหน้าอาหารทั้งหมด
ร15 (คล้าย Aspergillus)	1,2 ยุบตัวค่อนข้างมากมีการเจริญของเชื้อ มีน้ำมากที่ก้นจาน กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก ปริมาณน้ำมาก กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก ราเจริญเต็มไปหมด มีน้ำมาก
S. fiburigera	1,2 ยุบตัวเล็กน้อย น้ำแฉะที่ก้นจาน กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมากขึ้น30%ปริมาณน้ำมากขึ้น กลิ่นดีคล้ายข้าวหมาก	1,2 ยุบตัวมาก มีน้ำ 50% กลิ่นแอลกอฮอล์
E. fiburigera	1,2 น้ำแฉะที่ก้นจาน กลิ่นดี	1,2 ยุบตัวมาก30 % ปริมาณน้ำมากขึ้น กลิ่นบูดเล็กน้อย	1,2 ยุบตัวมาก มีน้ำ50 % กลิ่นแอลกอฮอล์
Aspergillus sp. TISTR 3063	1.2สีข้าวเหนียวเปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อน	1,2 ข้าวเหนียวเป็นสีส้มเหลือง สังเกตเห็นการบุบตัวเล็กน้อยเฉพาะบริเวณผิวหน้า	1,2ข้าวเหนียวเป็นสีส้มเหลือง ยุบตัวเล็กน้อยบริเวณผิวหน้า
C. famata TISTR 5098	1,2 สีข้าวเหนียวเปลี่ยนเป็นสีครีม	1,2 ข้าวเหนียวเป็นสีส้มครีม ยุบตัวน้อยมากเฉพาะผิวหน้า กลิ่นดี	1,2 ข้าวเหนียวเป็นสีส้มครีม ยุบตัวเล็กน้อยบริเวณผิวหน้า
C. utilis TISTR 5001	1,2 สีข้าวเหนียวเป็นสีครีม	1,2ข้าวเหนียวมีสีส้มนอกนั้นไม่เปลี่ยนแปลง	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง
C. tropicalis TISTR 5087	1,2 ข้าวเหนียวเปลี่ยนไปเป็นสีส้มครีมยุบตัวเล็กน้อยบริเวณผิวหน้าอาหาร	1 ยุบตัวเล็กน้อยบริเวณผิวหน้า กลิ่นดีคล้ายข้าวหมาก 2 ยุบตัวเล็กน้อยบริเวณผิวหน้า มีน้ำเกิดขึ้นเล็กน้อย	1,2 ไม่เปลี่ยนแปลง
C. krusei TISTR 5099	1,2เกิดการยุบตัวเล็กน้อยประมาณ10 %	1,2 ยุบตัวมากมีน้ำเกิดขึ้นมากกลิ่นคล้ายข้าวหมาก มีกลิ่นแอลกอฮอล์	1,2 ยุบตัวมากมีน้ำมาก

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาแอคติวิตีของอะมิเลสในข้าวเหนียวนึ่งจากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ภายหลังการบ่ม 3 วัน

Isolate no.	ปริมาณกูลโคส (mg/g)
Control	0.18
รา no.2	-
รา no.4*	1.10
รา no.5*	0.52
แบคทีเรีย no.6*	1.82
รา no.7*	0.99
แบคทีเรีย no.8	0.63
แบคทีเรีย no.9	1.18
รา no.11*	0.89
แบคทีเรีย no.13	0.49
แบคทีเรีย no.14*	0.86
แบคทีเรีย no.19	0.18
แบคทีเรีย no.20*	0.71
รา no.23	0.73
ยีสต์ no.24	-
แบคทีเรีย no.25	-
แบคทีเรีย no.29	0.70
ยีสต์ no.60	1.00
ยีสต์ no.64*	1.24
แบคทีเรีย no.68	1.07
ยีสต์ no.69*	1.58
ยีสต์ no.72*	1.96
รา no.73	1.24
แบคทีเรีย no.79	1.24
ยีสต์ no.85	1.05
ยีสต์ no.94*	1.41
แบคทีเรีย no.105	1.39

หมายเหตุ plate control : ข้าวเหนียวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, *นำไปศึกษาหา Amylase activity ต่อไป

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หา Amylase activity เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีมันเส้นบด 8% จากการวิเคราะห์จากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตขึ้น

Culture Strain	Total Protein (mg)	Alpha amylase		Beta amylase		Glucoamylase	
		Total act. (Units)	Specific act. (Units/mg)	Total act. (Units)	Specific act. (Units/mg)	Total act. (Units)	Specific act. (Units/mg)
No culture	0.1200	0.49	4.08	0.56	8.68	0.38	3.16
Typical mold bran	0.0875	1.25	14.29	-	-	1.89	21.65
Yeast G	0.0350	1.10	31.55	1.04	29.77	1.52	43.29
Yeast 69	0.0390	0.81	20.84	0.63	16.03	-	-
Yeast 4A	0.1125	0.52	4.63	0.67	5.93	0.63	5.61
Yeast 3A	0.0275	0.93	33.72	0.42	15.15	-	-
Mold SUT.1	0.0800	2.81	35.16	1.25	15.63	-	-
Rhizopus	0.0450	1.04	23.15	-	-	0.38	8.42
Penicillium	0.0575	1.88	32.61	-	-	1.26	21.96
Endomycopsis	0.0500	1.46	29.17	1.25	25.00	2.53	50.51
Saccharomycopsis	0.0240	2.19	91.16	-	-	2.90	121.00

1 หน่วยเอนไซม์ Alpha amylase และ Beta amylase = ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งคิดเป็นไมโครโมล (μmole) มอลโทส ต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส

1 หน่วยเอนไซม์ glucoamylase = ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งคิดเป็นไมโครโมล (μmole) กลูโคส ต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ประวัตินักวิจัย

Name : Nantakorn Boonkerd

Position : Chair, Research Department, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology and Director of BNF Resource Center for S&S/E Asia.

Address : Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

Date of Birth : October 15, 1942

EDUCATION :

Ph. D. Soil Microbiology 1981-Texas A&M University, USA. Dissertation: Survival and Effectiveness Stability of Cowpea Rhizobium as Affected by Soil Temperature and Moisture.

M. S. Soil Microbiology 1972-University of Maryland, USA. Thesis : Influence of *Rhizobium japonicum* Strains and Inoculation Methods in *Rhizobium* Free and *Rhizobium* Established Soils.

B. S. Soil Science 1966-Kasetsart University Thailand. Thesis : Decomposition of Municipal waste : II. Gaseous Ammonia Loss at Elevated Temperature.

EMPLOYMENT :

1993-Present Department of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Chair Research Department.

1966-1993 Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

1985-present Director of Biological Nitrogen Fixation Resource Center for South and Southeast Asia. Chief of Soil Microbiology Research Group and Research Leader in BNF. Responsible for researches in biological nitrogen fixation, especially in rhizobia and inoculant production.

1981-1985 Research Leader in *Rhizobium* and *Frankia*. Supervisor in industrial rhizobial inoculant production and quality control. Develope large scale inoculant production (200 tons/year) as well as small scale production.

1879-1981 Graduate Research Assistant study for Ph.D. at Texas A&M University College Station, Texas.

1973-1979 Research Leader in *Rhizobium* and inoculant production.

1970-1973 FAO Fellowship study for M. S. at University of Maryland, USA.

1966-1973 Research Leader in the use of *Rhizobium* to increase yield of economic legumes and green manuring legumes.

RESEARCH GRANTS AWARDED :

USAID-Collabrative Research Support Program (CRSP) in peanut rhizobia, 1983-1988.

Methods to culture, maintain, and propagate *Azolla* under tropical conditions, 1985-1988. Awarded by BOSTID, US national Academy of Sciences.

The enhancement of the biological nitrogen fixation by genetic engineering technique. NCGEB, 1985-1988

Screening with nuclear and other techniques for yield and N_2 fixation in mungbean. IAEA 1986-1987.

Molecular identification of *Frankiae* using cross inoculation group specific DNA sequences. PSTC 1987-1989.

Increasing biological nitrogen fixation of peanuts in developing countries. US-ISRAEL CDR Program, 1987-1990.

Identification of rhizobium strains by genetic engineering for enhancement of N_2 fixation and inoculant production. NCGEB 1987-1989.

Exploitation of new technologies to monitor the survival and nodulating effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of soybean. Commission of the European Communities. 1989-1993.

Ecologically based models for prediction of legume inoculation requirement. USAID-PSTC 1989-1992.

On-farm optimization of biological nitrogen fixation of grain legumes. Commission of the European Communities. 1990-1993.

Screening with nuclear and other techniques for yield and N_2 fixation in grain legumes. IAEA 1990-1994.

Breeding of nitrogen-fixing bacteria in southeast asia. Monbusho International Scientific Research Program. 1994-1997.

Name : Assistant Professor Dr. Sureelak Rodtong

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

Education :

Degree	Year	Institution/Country
B.Sc.(Biology,Option Microbiology)	1981	Kasetsart University, Thailand
M.Sc. (Microbiology)	1984	Kasetsart University, Thailand
PG Dipl.Sc.(Biotechnology) with credit	1990	University of Otago, New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	1993	University of Otago, New Zealand

Address : School of Microbiology, Institute of Science

Suranaree University of Technology

Nakhon Ratchasima 30000. Thailand Tel. (66 44) 224297 FAX (66 44) 224185

E-mail sureelak@ccs.sut.ac.th

Experience :

Assistant Professor, School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, April 1996 - present.

Lecturer, School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, May 1994 - April 1996.

Lecturer, Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 1984 - May 1994.

Publications : **Books/Handouts (from 1993 onwards)**

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2537. **เอกสารประกอบการสอนวิชา 104 202 ปฏิบัติการจุลชีววิทยา.** นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 73 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2538. **จุลินทรีย์และโรคซึ่งเกิดจากอาหาร.** นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 92 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2538. **อาหารเป็นพิษจากจุลินทรีย์.** นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลเทคโนโลยีสุรนารี. 34 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2540. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม (เอกสารประกอบการสอนวิชา 503 205 ชีววิทยาสิ่งแวดล้อม [ภาคปฏิบัติการ].** นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 89 หน้า.

Papers published in international and national journals/conferences/conference abstracts

Rodtong, S., and G.W. Tannock. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3480-3484.

Rodtong, S., G.W. Tannock, and K.H. Wilson. 1993. Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. The Nucleotide Sequence Databank (GenBank [USA]). Accession No. L23507.

Rodtong, S., S. Dobbinson, S. Thode-Andersen, M.A. McConnell, and G.W. Tannock. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3871-3877.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Direct polymerase chain reaction detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in raw milk. *Abstracts of the 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 187.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Polymerase chain reaction detection of coagulase gene of mastitic *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Abstracts of the 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 186.

Rodtong, S., N. Teaumroong, and P. Chooklay. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of the Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

Rodtong, S, and N. Teaumroong. 2000. Edible mushrooms in dry dipterocarp forest of Tup Lan National Park in Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 105.

Boonkerd, N, P. Chumkhunthod, **S. Rodtong,** and N. Teaumroong. 1999. Bioconversion of cassava and its waste for animal feed. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 248.

Tannock, G.W., A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4264-4267.

Teaumroong, N., M. Manassila, **S. Rodtong,** and N. Boonkerd. 1999. Genomic fingerprint of edible mycorrhizal mushrooms in Family *Russulaceae* collected fron Northeastern, Thailand. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 346.

Walter, J., G.W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, D.M. Loach, and K. Munro. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1):297-303.

Reynolds, C., M. Donovan, **S. Rodtong**, and A.J.S. Whalley. 2000. Characterisation of fungal and other lectins: an overview. *Abstracts of the Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 8.

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and **S. Rodtong**. 2000. ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

NAME : Neung Teaumroong

NATIONALITY : Thai

SEX : Male

DATE AND PLACE OF BIRTH : July 21 1965, Bangkok

POSITION : Head of Research Department
Institute of Agicultural Technology
(April 1999-present)

ADDRESS : School of Biotechnology
Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000
E-mail : neung@ccs.sut.ac.th
Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

PUBLICATIONS

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Hasch[illegible]dter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Teaumroong, N., K. Teaamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia*. Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196